



Interactions protéines-membranes : conséquences sur l'état physique et l'organisation des lipides

Liberty François-Moutal

► To cite this version:

Liberty François-Moutal. Interactions protéines-membranes : conséquences sur l'état physique et l'organisation des lipides. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10062 . tel-01343296

HAL Id: tel-01343296

<https://theses.hal.science/tel-01343296>

Submitted on 8 Jul 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 62-2013

Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES SANTE
(EDISS)

DIPLOME DE DOCTORAT DE BIOCHIMIE

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 18/04/2013

par

Mme FRANCOIS-MOUTAL Liberty

INTERACTIONS PROTEINES-MEMBRANES: CONSEQUENCES SUR L'ETAT PHYSIQUE
ET L'ORGANISATION DES LIPIDES

Directeur de thèse : Dr. Olivier MARCILLAT

JURY :

Mme BERNARD Sophie (rapporteur)
M BUCHET René
M GRANJON Thierry
M MARCILLAT Olivier
M PETIT Patrice
Mme ROSILIO Véronique (rapporteur)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Directeur : M. N. SIAUVE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : Mme S. FLECK

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. R. BERNARD

Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Thierry et Olivier pour leur accueil. Vous m'avez donné le goût à la recherche... et Thierry tu m'as poussé à faire une thèse, merci à toi.

Merci à Ofélia, qui a été présente à un moment et à un endroit inattendu, et qui a toujours été là pour discuter et échanger des idées.

Je remercie toute l'équipe ODMB, pour leur bonne humeur, leur accueil chaleureux. Merci à René BUCHET, qui a accepté d'être président du jury.

Je remercie Patrice PETIT pour m'avoir permis de travailler avec lui sur le sujet capase-8-cardiolipine, et pour l'aide qu'il m'a apporté. Merci d'avoir accepté de faire partie du jury.

Merci à Myriam OUBERAI de Cambridge pour les expériences de DPI sur la NDPK-B, pour sa disponibilité et les heures au téléphone à discuter.

Merci à Marie-Lise LACOMBE qui a fourni le plasmide permettant l'expression des isoformes de NDPK.

Je remercie l'équipe Neuro-oncologie et neuro-inflammation du CNRL pour les images d'épifluorescence.

Je remercie Véronique ROSILIO et Sophie BERNARD qui ont accepté de prendre le temps d'être rapporteur de ma thèse.

Merci à tous les stagiaires que j'ai fait « trimer » pendant de longues journées, j'espère qu'ils gardent un aussi bon souvenir de leur expérience que moi, c'était un réel plaisir de travailler avec eux : Selma, Maud, Charlotte, Vincent, Anissa, Meryem, Gultekin, Julien et Vartan.

Je remercie mes parents, sans qui évidemment je ne serai pas là. Vous m'avez toujours poussé à aller plus loin et à toujours faire mieux. Merci pour votre soutien et votre amour inconditionnels, même dans les moments difficiles.

Merci aussi à mes amis, les meilleurs des meilleurs : Stef, Couette, JB, Laurent, Marmotte et les autres. Merci d'être là, toujours le sourire aux lèvres et le mot pour rire. Je ne sais pas comment j'aurai survécu sans ces moments.

Pour finir, merci à mon mari Aubin. Merci d'être là, merci d'être si sur de tout et de moi en particulier. Tu m'as toujours poussé à voir plus loin. Je t'aime.

RESUME :

Les isoenzymes de nucléoside diphosphate kinase (NDPK) sont connues depuis maintenant presque 60 ans et n'ont été considérées que pour leur activité catalytique de transfert de groupement phosphoryle. La découverte du gène *nme*, un gène antimétastatique codant une NDPK, a renouvelé l'intérêt scientifique pour cette famille d'enzymes. Il est désormais connu que la multiplication des gènes durant l'évolution a été accompagnée de diversifications structurales et fonctionnelles.

J'ai étudié la fixation des NDPK-A, -B et -D (retrouvée associées aux membranes biologiques, bien que le rôle de cette association soit encore méconnu) à des membranes modèles, et j'ai trouvé des différences dans les mécanismes de fixation. J'ai montré la capacité de la NDPK-D, isoforme mitochondriale, à interagir avec des membranes anioniques ou zwitterioniques, à augmenter leur fluidité et à former des domaines protéolipidiques en présence de CL, lipide anionique spécifique de la membrane mitochondriale interne. J'ai observé cette capacité à former des domaines protéolipidiques avec d'autres protéines interagissant avec la CL, comme la créatine kinase mais pas le cytochrome *c*.

La NDPK-A ne se fixe pas aux phospholipides du feuillet interne de la membrane plasmique, ce qui suggère un autre partenaire *in vivo*.

La NDPK-B n'interagit qu'avec des membranes anioniques via un processus en deux étapes, provoque une diminution de fluidité et est capable de former des domaines protéolipidiques.

La ségrégation des lipides anioniques induite par la fixation de protéines pourrait contribuer à la formation de plateformes au sein de la membrane susceptibles de servir de point d'ancrage à de nombreuses molécules, modulant ainsi les fonctions cellulaires.

DISCIPLINE : BIOCHIMIE

MOTS-CLES :

Interactions protéines lipides, isoformes de nucléoside diphosphate kinases, créatine kinase mitochondriale, cytochrome *c*, caspase-8, Bid, cardiolipine, spectroscopie de fluorescence, liposomes, monocouches, bicouches supportées, microscopie à angle de Brewster, spectroscopie infrarouge

LABORATOIRE :

ICBMS (Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires) UMR5246
Laboratoire ODMB (Organisation et Dynamique des Membranes Biologiques)
Bâtiment Raulin 2^{ème} étage
43, boulevard du 11 novembre 1918
69622 Villeurbanne cedex

ABSTRACT

Nucleoside diphosphate kinase isoenzymes (NDPK) have been known for nearly 60 years and, until recently, have been considered as housekeeping enzymes. The discovery of a *nme* gene, an antimetastatic gene that codes for a NDPK, revived the interest for this family. It is now known that the multiplication of *nme* genes throughout evolution has been accompanied with structural and functional diversification. I studied the binding of NDPK-A, -B and -D (which are retrieved associated to cellular membranes where they are thought to play several roles) to model membranes and found differences in their behavior towards different compositions of phospholipids. I showed the ability of the NDPKD mitochondrial isoform to interact with both anionic and zwitterionic membranes, to modify their fluidity and to form proteolipidic domains in presence of CL, a mitochondrial inner membrane specific anionic lipid. I observed this ability to form proteo-cardiolipin domains with other CL interacting protein like creatine kinase but not with cytochrome c.

NDPK-A was not able to bind to inner leaflet plasma membrane mimicking systems suggesting another partner *in vivo*. Concerning NDPK-B, it interacted only with anionic membranes via a two step-process, induced a decrease of the membrane fluidity and was able to form proteolipidic domains.

Such anionic lipid segregation triggered by protein binding may contribute to platforms formation within membranes. Those platforms are then susceptible to provide a functional docking platform for numerous molecules and thus to modulate cellular functions.

FIELD : BIOCHEMISTRY

KEY WORDS :

Protein-lipids interactions, nucleoside diphosphate kinases isoforms, mitochondrial creatine kinase, cytochrome c, caspase-8, Bid, cardiolipin, fluorescence spectroscopy, liposomes, monolayers, supported bilayers, Brewster angle microscopy, infrared spectroscopy

LABORATORY :

ICBMS (Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires) UMR5246
Laboratoire ODMB (Organisation et Dynamique des Membranes Biologiques)
Bâtiment Raulin 2^{ème} étage
43, boulevard du 11 novembre 1918
69622 Villeurbanne cedex

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
ANS : acide 8-anilino-1-naphtalène sulfonique
ANT : transporteur des nucléotides adényliques
ATP : adénosine triphosphate
BAM : microscopie à angle de Brewster
BMP: bs(monoacylglycérol)phosphate
BSA : albumine de sérum bovin
Caméra CCD : Charge-Coupled Device
Cer : céramides
CKmt : créatine kinase mitochondriale
CL: cardiolipine
CV-1 : cellules de rein de singe africain
DAG : diacylglycérol
DEAE : diéthylaminoéthyl
DMPC: dimyristoylphosphatidylcholine
DMPG: dimyristoylphosphatidylglycérol
DMPS : dimyristoylphosphatidylsérine
DO : densité optique
DOC : désoxycholate de sodium
DOPC : dioléylphosphatidylcholine
DPI : dual polarization interferometry
DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholine
DSPC : distearylphosphatidylcholine
DTT : dithiothréitol
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
ER : réticulum endoplasmique
Etat FC : état Franck Codon
FTIR : fourier transformed infrared spectroscopy
GalCer : galactosylcéramide
GFP : green fluorescent protein
GP : polarisation généralisée
GSLs : glycosphingolipides
GTP : guanosine triphosphate
GUV: giant unilamellar vesicles
HEK 293 : Human embryonic kidney (épithélium rénale embryonique)
HEp-2 : cellules tumorales de carcinome laryngé humain
ICAP-1 α : integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 α
IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IR: infrarouge
ISL : sphingolipide inositol
Kpn : killer of prune
KSR : kinase suppressor of ras
LB : lysogen broth
LDH : lactate déshydrogénase
LUV : large unilamellar vesicles
MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7 (cellules de lignée du cancer du sein)
MCR-5 : fibroblastes diploïdes issus de poumons foetaux humains

MDA-MB-231: M.D. Anderson - Metastatic Breast (cancer mammaire)
 MLV : multilamellar vesicles
 NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
 NDPK : nucléoside diphosphate kinase
 Nme : non metastatic cell
 NTP : nucléoside triphosphate
 PA : acide phosphatidique
 PA : persulfate d'ammonium
 PC: phosphatidylcholine
 PE: phosphatidyléthanolamine
 PEP: phosphoénolpyruvate
 PG : phosphatidylglycérol
 PGF-A : platelet-derived growth factor-A
 pI : point isoélectrique
 PI : phosphatidylinositol
 PI(3,2)P2 : phosphatidylinositol-(3,5)-bisphosphate
 PI(3,4,5)P3 : phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate
 PI(4,5)P2 : phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate
 PI4P : phosphatidylinositol-4-phosphate
 PIM : pression d'insertion maximale
 PK : pyruvate kinase
 PL : phospholipid
 PS : phosphatidylsérine
 PTP : pore de transition de perméabilité
 REES : red edge excitation shift
 rp2 : gène retinitis pigmentosa
 S1P : sphingosine-1-phosphate
 SCC : oral squamous cell carcinoma
 SDS : sodium dodecyl sulfate
 SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium
 SM : sphingomyéline
 Sph : sphingosine
 SUV : small unilamellar vesicles
 TCA : acide trichloracétique
 TDP : thymidine diphosphate
 TE : transverse électrique
 TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
 TG : triacylglycérol
 TIM : translocase of the inner membrane
 T_M : température de transition de phase
 TM : transverse magnétique
 TOM : translocase of the outer membrane
 Tris : tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
 Trisacryl : N-acryloyl-2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
 TTP : thymidine triphosphate
 UDP : uridine diphosphate
 UV : ultra violet
 VDAC : voltage dependant anion channel
 XRP2 : X-linked retinitis pigmentosa

Liste des figures

Figure 1 : Les différents gènes nme et leur protéines associées

Figure 2: Structure de l'homohexamère de NDPK du groupe

Figure 3 : Structure d'un monomère

Figure 4 : Mécanisme de l'activité NDPK

Figure 5: Site actif de la NDPK fixée à un substrat dans son état de transition

Figure 6 : Schéma du transfert de phosphate catalysé par la NDPK en présence de phospholipides

Figure 7 : Modèle fonctionnel d'interaction de la NDPK-D avec les membranes mitochondriales

Figure 8 : Modèles généraux des membranes

Figure 9 : Modèle moléculaire d'un phospholipide

Figure 10 : Les fonctions du PIP_2

Figure 11 : Synthèse lipidique et composition des membranes cellulaires

Figure 12: Les constituants des radeaux lipidiques

Figure 13 : Théories de formation des rafts

Figure 14: Les fonctions associées aux radeaux lipidiques

Figure 15: Structure de la cardiolipine

Figure 16: Rôle de la CL dans les processus mitochondriaux

Figure 17 : Transition de phase de la phosphatidylcholine

Figure 18 : a. Explication énergétique de la formation de vésicule lipidique dans un milieu aqueux. b. Schéma récapitulatif de la formation des différents types de liposomes

Figure 20 : Modèle des deux états

Figure 21: Structure et localisation du Laurdan dans la couche externe de la bicouche phospholipidique

Figure 22 : Spectres d'excitation et d'émission normalisés du Laurdan dans des vésicules multilamellaires de DPPC

Figure 23: (A) Spectre de polarisation généralisée du Laurdan dans des vésicules de DPPC à des températures différentes (B) GPexcS et GPemS en fonction de la température

Figure 24 : Modèle de l'oscillateur harmonique

Figure 25 : Schéma représentant les forces existantes entre les molécules dans un liquide

Figure 26 : Balance de Wilhemy

Figure 27 : Principe de la microscopie à angle de Brewster

Figure 28 : Image de microscopie à angle de Brewster de monofilms de compositions lipidiques différentes

Figure 29 : Principe de l'onde évanescente

Figure 30 : Principe du Dual Polarization Interferometry

Figure 31 : Biréfringence d'une membrane supportée

Figure 32 : Système enzymatique couplé permettant le test d'activité de la NDPK

Figure 33 : Structure du cytochrome c humain

Figure 34 : La microcompartimentation fonctionnelle

Figure 35 : Structure octamérique de la CKmt sarcomérique de poulet, en vue latérale

Figure 36 : Pourcentages de fixation de cytochrome c, de CKmt et de NDPK-D sur des liposomes de compositions différentes

Figure 37 : Variations du GP d'excitation induit par la fixation du cytochrome c, de la CKmt et de la NDPK-D

Figure 38 : Images de BAM de CKmt ou de cytochrome c sur des monocouches de CL

Figure 39 : Images de BAM du cytochrome c sur des monocouches de CL

Figure 40 : Histogramme représentant les taux de fixation de la NDPK-B aux différentes vésicules

Figure 41 : GPex et GPS du Laurdan inséré dans des liposomes de type DMPC-DMPG (70-30)

Figure 42 : GPex et GPS du Laurdan inséré dans des liposomes de type DMPC-DMPG-cholestérol (60-30-10)

Figure 43: GPex et GPS du Laurdan inséré dans des liposomes de type DMPC-DMPS (70-30)

Figure 44 : GPex et GPS du Laurdan inséré dans des liposomes de type DMPC-DMPS-cholestérol (60-30-10)

Figure 45 : Images de BAM d'une monocouche de PC-PE-PS-PI en présence de 4 nM de NDPK-B.

Figure 46 : Images de BAM d'une monocouche de PS en présence de 4 nM de NDPK-B.

Figure 47 : Effet de l'augmentation de la pression de surface dans une monocouche phospholipidique induite par l'injection de 4 nM de NDPK-B à 21°C.

Figure 48: Effet de l'augmentation de la pression de surface dans une monocouche phospholipidique induite par l'injection de 4 nM de NDPK-B à 21°C.

Figure 49 : Variation de la masse (en ng/mm²) en fonction du temps (s) suite à l'injection de 1 µM de NDPK-B sur une bicouche de PC-PE-PS-PI

Figure 50 : Variation de biréfringence en fonction de la variation de masse (ng/mm²) suite à l'injection de NDPK-B sur les deux bicouches Figure 51: Variation d'absorbance en fonction du temps

Figure 52 : Variation d'absorbance à 450 nm de liposomes PC-PE-PS-PI-ch suspendus dans des tampons de différentes forces ioniques

Figure 53 : Variation de DO à 450nm d'une suspension de liposomes

Figure 54 : Turbidité d'une solution de NDPK-B en présence d'une suspension de liposomes PC-PE-PS-PI suite à des ajouts successifs de NaCl 50 mM ou d'ATP

Figure 55 : Visualisation de GUVs en épifluorescence

Figure 56 : Pourcentage de fixation de la NDPK-B en fonction de la concentration en lipides accessibles

Figure 57 : les deux voies principales d'activation de la mort cellulaire programmée

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des isoformes de nm23 humaines.

Tableau 2 : Localisation cellulaire des isoformes de NDPK.

Tableau 3 : Composition lipidique en pourcentage massique des différentes membranes.

Tableau 4 : Pourcentages d'acides gras dans les cellules endothéliales.

Tableau 5 : Composition en poids des acides gras présents dans les membranes et les sites de contact des mitochondries.

Tableau 6 : Position des bandes caractéristiques des principales structures secondaires dans l'eau lourde.

Tableau 7 : Compositions en acides gras des différents phospholipides utilisés.

Tableau 8 : Valeurs des deltas de pressions théoriques à une pression initiale de 0 mN/m ($\Delta\pi_0$) pour différentes monocouches.

Tableau 9 : Valeurs de pression d'insertion maximale et de facteur de synergie de la NDPK-B pour des monocouches de compositions différentes.

Tableau 10 : Masse (ng/mm²) et biréfringence des compositions lipidiques utilisées. L'aire moléculaire est calculée en prenant en compte l'aire totale de la surface de dépôts (17 mm²).

Tableau 11 : Tableau des résultats de constante de dissociation de la NDPK-B pour 3 compositions lipidiques différentes.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	13
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	16
Chapitre 1 : La famille des Nm23	16
1.1. Les isoformes de Nm23 humaines	16
1.2. Rôles métaboliques associés à l'activité NDPK	23
1.3. Rôles physiologiques	24
1.4. NDPKs et membranes	26
Chapitre 2 : Les membranes biologiques	29
2.1. Les différentes classes de lipides membranaires	30
2.2. Composition des membranes biologiques	34
2.3. Les membranes : état physique	39
2.4. Les phases des lipides	42
Chapitre 3 : Les interactions protéine/membranes	43
3.1. Les modèles membranaires	43
3.2. Les techniques de caractérisation des interactions protéine-modèle membranaire	46
MATERIELS ET METHODES	62
Chapitre 1 : Matériels	62
1.1. Phospholipides	62
1.2. Protéines	62
1.3. Sondes fluorescentes	63
Chapitre 2 : Purifications des NDPK	63
2.1. Clonage de l'ADNc des NDPKs	63
2.2. Transformation de bactéries CaCl ₂ compétentes	63
2.3. Surexpression des NDPKs	64
2.4. Extraction et purification	64
2.5. Test de l'activité NDPK	66
Chapitre 3 : Préparation des liposomes	67
3.1. Préparation des LUV	67
3.2. Préparation des GUVs par hydratation douce	68
Chapitre 4 : Interaction protéines-liposomes	68
4.1. Adsorption des NDPKs	68
4.2. Fluorescence	69
4.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	70
4.4. Etude de l'agrégation des liposomes par les NDPK	71
4.5. Etude de l'interaction des protéines avec des monocouches	71
4.6. Dual polarisation interferometry	73
Chapitre 5 : Comparaisons structurales des isoformes NDPK	74

RESULTATS/DISCUSSION	75
Chapitre 1 : Interaction de la NDPK-D avec les phospholipides de la membrane interne de la mitochondrie (Article 1, publié dans BBA biomembrane)	75
Chapitre 2 : Comparaison de l'effet de la fixation de la NDPK-D sur l'organisation et l'état physique des lipides des membranes mitochondriales avec deux autres protéines de l'espace intermembranaire : la CKmt et le cytochrome c	78
2.1.Rappels bibliographiques	78
2.2.Résultats :	82
2.3.Discussion :	86
Chapitre 3 : Les NDPK-A et NDPK-B, deux autres NDPK du groupe I sont retrouvées associées aux membranes : comparaison structurale	90
Chapitre 4 : Caractéristiques de l'interaction NDPK-B-phospholipides du feuillet interne de la membrane plasmique	109
4.1.Article NDPK-B	109
4.2.Influence de l'état physique des lipides sur la fixation de la NDPK-B aux membranes	128
4.3.Conséquences de la fixation de la NDPK-B sur la température de transition de phase des lipides	128
4.4.Formation de clusters protéo-lipidiques observés en BAM (expériences préliminaires)	134
4.5.Pénétration de la NDPK-B au sein des membranes biomimétiques	136
4.6.Agrégation des liposomes par la NDPK-B	144
4.7.Expériences préliminaires de calcul de constante de dissociation	149
4.8.Discussion :	151
CONCLUSION GENERALE/ PERSPECTIVES	158
Annexe : "Cardiolipin provides a docking platform for caspase-8 activation that bridge Fas-induced apoptosis with mitochondria"	163
REFERENCES	168

Introduction générale

Les membranes biologiques, définies comme des assemblages protéolipidiques complexes, sont des structures universellement conservées au cours de l'évolution, ce qui suggère leur importance dans le fonctionnement normal des cellules et des organites. Les membranes sont de véritables interfaces permettant un échange efficace d'énergie, de signal et de contenu biologique. Il est donc nécessaire que ces interfaces soient dynamiques mais avec une distribution non aléatoire des composants. L'énorme variété structurale des lipides qui composent les membranes et le grand nombre de protéines qui interagissent avec elles, sont à l'origine d'une large hétérogénéité spatio-temporelle de l'organisation de la membrane. Cette hétérogénéité se retrouve aussi dans la formation de domaines impliqués dans un certain nombre de processus cellulaires. L'étude des mécanismes à l'origine de la genèse des domaines membranaires permettra de mieux comprendre l'organisation des membranes et l'influence des propriétés physiques des domaines lipidiques sur leur différentes fonctions.

L'architecture complexe des membranes biologiques représente un inconvénient majeur pour déterminer l'importance de tel ou tel lipide ou protéine *in vivo*, principalement à cause du grand nombre d'évènements interférents. Une approche ascendante est par conséquent à envisager. Les modèles membranaires peuvent être utilisés pour isoler un système biologique et identifier sa fonction, et une des approches possibles dans la compréhension des phénomènes liés aux membranes biologiques est l'étude de la réalisation d'une fonction biologique particulière, telle la fixation d'une protéine.

Notre étude s'est focalisée sur plusieurs interactions protéine/modèle membranaire, le manuscrit est divisé en 5 volets. L'essentiel de ma thèse s'est portée sur l'étude des interactions Nucléoside Diphosphate Kinase (NDPK)-phospholipides.

Les NDPK sont des enzymes qui catalysent le transfert réversible du phosphate gamma d'un nucléoside triphosphate vers un nucléoside triphosphate et ont longtemps été considérée comme des enzymes de l'homéostasie cellulaire. Alors que cette activité est connue depuis près de 60 ans, ce n'est que depuis une vingtaine d'années que l'on entrevoit la complexité de cette famille de protéines.

Certaines isoformes ont été retrouvée associées avec des membranes biologiques : la NDPK-D avec la membrane interne de la mitochondrie et les isoformes NDPK-A et NDPK-B au niveau de la membrane plasmique notamment.

Le premier volet se focalise sur l'interaction de l'isoforme mitochondriale de nucléoside diphosphate kinase (NDPK-D) avec les phospholipides de la membrane interne de la mitochondrie et notamment avec la cardiolipine (CL), un phospholipide particulier impliqué dans de nombreux processus physiopathologiques. La fixation de la NDPK-D sur des membranes modèles a montré sa capacité à interagir avec des compositions zwitterioniques et anioniques. L'effet sur l'état physique des membranes, étudié par spectroscopie de fluorescence et infrarouge, et l'organisation des phospholipides, visualisée grâce à l'utilisation d'une microscopie d'interface, semblent différents selon la charge de la membrane et les résultats indiquent la capacité de la NDPK-D à former des domaines protéolipidiques impliquant la CL. Nous avons également montré le changement structural de la NDPK-D suite à son interaction avec les membranes par spectroscopie infrarouge et suivi de la fluorescence des tryptophanes. Cette étude fait l'objet d'un article paru dans BBA.

Le deuxième volet quant à lui, porte sur la comparaison des interactions NDPK-D-phospholipides de la membrane interne de la mitochondrie avec celles de deux autres protéines mitochondriales de l'espace intermembranaire, le cytochrome *c*, protéine la plus abondante, et la CKmt, une autre enzyme impliquée dans le transfert d'énergie et dont l'architecture est proche de celle de la NDPK-D. Les données de fluorescence extrinsèque et de microscopie à angle de Brewster montrent le faible effet du cytochrome *c* sur l'organisation des phospholipides par rapport à la CKmt et la NDPK-D.

Le troisième volet porte sur les NDPK-A et NDPK-B, deux autres isoformes retrouvées associées avec un certain nombre de membranes biologiques comme la membrane plasmique ou le réticulum endoplasmique. Ces deux NDPK et la NDPK-D présentent des pourcentages d'identité élevés (53 à 88%), pourtant elles présentent un certain nombre de différences (point isoélectrique, localisation cellulaire,...). L'étude de l'interaction de ces trois isoformes avec des liposomes modèles, a montré que l'isoforme NDPK-A est incapable de se fixer aux phospholipides dans nos conditions, suggérant l'implication d'un partenaire non lipidique *in vivo*. Les NDPK-B et-D présentent des modes de fixation différents. Nous avons alors étudié certaines caractéristiques structurales de ces isoformes. Alors que leurs structures secondaires sont identiques, les trois isoformes présentent des structures tertiaires et des zones hydrophobes de surface, qui sont différentes pouvant expliquer leurs différences de comportement vis-à-vis des lipides.

Une quatrième partie porte sur l'interaction de la NDPK-B avec les lipides du feuillet interne de la membrane plasmique. La fixation de la NDPK-B sur des membranes modèles a montré sa capacité à interagir avec des compositions uniquement anioniques et de pénétrer de manière partielle ces membranes (montré en collaboration avec le Dr. Myriam OUBERAI). L'effet de cette fixation sur l'état physique des lipides, étudié par spectroscopie de fluorescence et infrarouge, montrent une baisse de la fluidité de la membrane. Cette baisse de fluidité s'accompagne d'une réorganisation de la membrane, visualisée par microscopie d'interface ainsi que d'une insertion partielle de la protéine au sein des phospholipides. Nous avons également montré le changement structural de la NDPK-B suite à son interaction avec les membranes par spectroscopie infrarouge et suivi de la fluorescence des tryptophanes.

Pour finir, je me suis également intéressée, grâce à une collaboration avec le Dr. Patrice PETIT, à la fixation de protéines proapoptotiques, la caspase-8 et tBid (forme tronquée de Bid appelé Bid-FL), sur la cardiolipine. La capacité de la caspase-8 et de tBid à diminuer la fluidité membranaire a été mise en évidence. Nous avons supposé que cet effet peut être relié la mise en place d'une plateforme fonctionnelle caspase-8-CL qui permet le clivage de Bid-FL en tBid. Ces résultats ont été intégrés à un article paru dans PLoS.

Rappels bibliographiques

Chapitre 1 : La famille des Nm23

Les nucléoside diphosphate kinases (NDPK), EC 2.7.4.6, catalysent non spécifiquement le transfert du groupement phosphate terminal depuis un nucléoside triphosphate vers un nucléoside diphosphate. Cette activité a été découverte en 1953 par Berg et Joklik chez la levure (Berg et Joklik, 1953). Les nucléosides triphosphates néo-formés sont alors utilisés dans les processus anaboliques de la cellule, faisant des NDPK, des acteurs clés dans la synthèse des macromolécules biologiques.

En 1988, Steeg *et al.*, ont mis en relation la formation de métastases dans des lignées de mélanome murin avec la baisse d'expression, par rapport à des lignées pauvrement métastatiques, d'un gène de fonction alors inconnu, le gène nm23 (non metastasic clone 23, appelé désormais nme).

En séquençant les produits des gènes nme1 et 2, Wallet *et al.*, ont découvert en 1990 qu'ils ont respectivement pour produit les NDPK-A et -B. Cette découverte a apporté un regard nouveau sur cette famille d'enzymes qui n'était jusqu'alors considérée que comme des enzymes contrôlant l'homéostasie cellulaire (Roymans *et al.*, 2002).

Il est à noter que certains produits des gènes nme ne présentent pas d'activité NDPK, ils seront donc appelés selon la nomenclature décrite dans Lacombe *et al.*, 2009 (Nm23-H5 par exemple).

1.1. Les isoformes de Nm23 humaines

Chez l'humain, 10 gènes ont été reportés comme faisant partie de la famille NDPK : nme1 à nme9 ainsi que le gène rp2 codant une forme tronquée de Nm23 appelée XRP2. Parmi les protéines codées, le domaine NDPK apparait seul ou associé à d'autres domaines (protéines Nm23-H5, Nm23-H7, Nm23-H9, RP2).

Les caractéristiques et propriétés de la plupart des isoformes sont répertoriées dans le Tableau 1.

L'alignement des séquences et l'étude de l'arbre phylogénétique indiquent que la famille des nm23 se divise en deux groupes distincts.

- groupe I : nme1 à nme4 codant les NDPK-A à D.

Les protéines de ce groupe sont hautement homologues (58 à 88% d'identité) : leurs masses moléculaires diffèrent peu, elles possèdent une activité NDPK définie et sont conservées d'une espèce à l'autre (Gonin *et al.*, 1999). Cependant, malgré leur haut pourcentage d'identité, elles présentent des pHi très variables (de 5.83 à 10.3).

Figure 1 de l'article Boissan *et al.*, 2009

Figure 1 : Les différents gènes nme et leur protéines associées tiré de (Boissan *et al.*, 2009).

Isoforme	Taille (aa)	Masse moléculaire(Da)	pI	Expression tissulaire	Activité NDPK
Nm23-H1/NDPK-A	152	17 149	5,83	ubiquitaire	Oui
Nm23-H2/NDPK-B	152	17 298	8,52	ubiquitaire	Oui
Nm23-H3/NDPK-C	168	18 903	6,91	ubiquitaire	Oui
Nm23-H4/NDPK-D	187	20 659	10,3	ubiquitaire	Oui
Nm23-H5	212	24 236	5,89	flagelles, cils	Non
Nm23-H6/NDPK-F	186	21 142	8,51	ubiquitaire	Oui
Nm23-H7	376	42 492	6,03	flagelles, cils	Non Décrite
Nm23-H8	588	67 270	4,9	flagelles, cils	Non
Nm23-H9	?	?	?	flagelles, cils	Non Décrite
Nm23-H10(XRP2)	350	39 000 (calculée)	?	ubiquitaire	Non Décrite

Tableau 1 : Caractéristiques des isoformes de nm23 humaines.

- groupe II : nme5 à 9 et rp2 codant les Nm23-H5, NDPK-F, Nm23-H7 à Nm23-H10(XRP2).

Ce groupe est quant à lui plus divergent (25 à 45% d'identité) : les masses moléculaires des protéines appartenant à ce groupe sont clairement distinctes. La plupart des gènes du groupe II est essentiellement exprimée dans les structures ciliées de type cil primaire ou flagelle du spermatozoïde. La seule exception est Nm23-H6/NDPK-F, exprimée dans le cœur, le placenta, le muscle squelettique, et qui semble être également le seul membre de ce groupe à présenter une activité NDPK (Tsuiji *et al.*, 1999).

1.1.1. Localisation subcellulaire

Lacombe *et al.* (2000 et 2009) ont répertorié les localisations subcellulaires des différentes isoformes NDPK dans le Tableau 2.

La distribution des NDPK-A et -B a été analysée par microscopie de fluorescence grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux hautement spécifiques et fluorescents, dans des lignées cellulaires de cancer du sein (MCF-7 et MDA-MB-231). Les cellules présentent une fluorescence granulaire et filamenteuse au niveau du cytoplasme, avec une intensification du signal autour du noyau, pour les deux NDPKs. La composante filamenteuse a été attribuée à une interaction des deux NDPK avec le réseau de microtubules. Leur distribution dans le cytoplasme est similaire (Pinon *et al.*, 1999).

Pinon *et al.*, 1999, montrent une localisation nucléaire uniquement dans le cas de la NDPK-B. Kraeft *et al.*, 1996 ont visualisé, par immunofluorescence, une localisation nucléaire de la NDPK-B dans les cellules de fibroblastes humains (MCR-5) et des cellules épithéliales (CV-1). Cependant, toutes les cellules en interphase ne présentaient pas de fluorescence dans le noyau, suggérant que la translocation de la NDPK-B était dépendante du cycle cellulaire.

Des expériences de transfection de cellules interphasiques HEP-2 avec les NDPK-A et B couplées à la GFP (green fluorescent protein) ont montré une localisation simultanée des deux isoformes dans le noyau et ont confirmé l'hypothèse soulevée par Kraeft *et al.* : les noyaux des cellules en phase G1 tardive et en phase G2/M avaient une fluorescence marquée alors que les noyaux des cellules en phase S étaient non marqués (Bosnar *et al.*, 2009; Bosnar *et al.*, 2004).

Des études sur l'expression de la NDPK-C fusionnée à la GFP, ont montré une localisation cytoplasmique imprécise mais elle semble associée, au moins en partie, avec les mitochondries (Martinez *et al.*, 1997; Negroni *et al.*, 2000).

L'étude de la séquence de la NDPK-D montre qu'elle possède 33 résidus d'acides aminés situés à l'extrémité N-terminale caractéristiques d'un signal de translocation mitochondrial et retrouvés dans aucune autre NDPK (Milon *et al.*, 1997). En 2000, la transfection de la NDPK-D fusionnée avec un tag GFP dans des cellules HEK 293 et la visualisation en microscopie confocale, valide la localisation mitochondriale (Milon *et al.*, 2000). Le fait que la NDPK-D soit uniquement localisée au niveau de la mitochondrie a été démontré par Western blot (Milon *et al.*, 2000).

Le signal de localisation mitochondriale est clivé lors de la translocation dans la mitochondrie ce qui permet l'exposition du site catalytique.

Isoforme	Localisation subcellulaire
Nm23-H1 (NDPK-A)	Cytoplasme, noyau
Nm23-H2 (NDPK-B)	Cytoplasme, noyau
Nm23-H3 (NDPK-C)	Cytoplasme
Nm23-H4 (NDPK-D)	Mitochondrie
Nm23-H5	Associé aux microtubules
Nm23-H6 (NDPK-F)	Cytoplasme, mitochondrie
Nm23-H7	Associé aux microtubules*
Nm23-H8	Associé aux microtubules ⁺
Nm23-H9	Associé aux microtubules
Nm23-H10 (XRP2)	Membrane cellulaire

Tableau 2 : Localisation cellulaire des isoformes de NDPK issu de Lacombe et al., 2000 et 2009.(Lacombe *et al.*, 2000). *(Ikeda, 2010); ⁺ (Duriez *et al.*, 2007)

Il est intéressant de noter que la localisation submitochondriale diffère selon les tissus et les espèces étudiées. Chez les mammifères, l'activité NDPK est retrouvée prédominante dans la matrice de la mitochondrie de cœur alors que dans le foie cette activité est retrouvée majoritairement dans l'espace intermembranaire.

En ce qui concerne les isoformes du groupe 2, seule la localisation de la NDPK-F est connue : mitochondrie et cytoplasme (Tsuiki *et al.*, 1999). La localisation des autres isoformes reste encore indéterminée.

1.1.2.Structure

La première structure tridimensionnelle de NDPK à être déterminée par cristallographie aux rayons X était celle de *Dictyostelium discoideum* (Dumas *et al.*, 1992) avec une résolution de 2,2 Å. Cette étude a été suivie par d'autres : l'enzyme de *Myxococcus*

xanthus (résolution de 2,0 Å) (Williams *et al.*, 1993), la NDPK Awd codée par le gène « *abnormal wing disc* » de *Drosophila melanogaster* (résolution de 2,4 Å) (Chiadmi *et al.*, 1993) et la NDPK-B humaine (résolution de 2,8 Å) (Morera *et al.*, 1995a).

La cristallographie aux rayons X indique que toutes les enzymes du groupe I possèdent des structures hexamériques (résolution entre 2,0 et 2,8 Å) (Figure 2) (Erent *et al.*, 2001; Giraud *et al.*, 2006; Milon *et al.*, 2000; Morera *et al.*, 1995b) (Domov *et al.*, données non publiées). La forme générale de l'hexamère est compacte : 70 Å de diamètre et 50 Å d'épaisseur et présente une symétrie d'ordre 2.

Chaque sous-unité de NDPK présente 4 feuillets β antiparallèles (appelés $\beta 1$ à $\beta 4$) et 5 hélices α (appelées $\alpha 1$ à 4 et αA). Les résidus 8-138 forment un domaine globulaire α/β , caractéristique de la plupart des kinases, et les résidus 139-155 un segment flexible (Figure 2) (Dumas *et al.*, 1992).

Figure 4 de l'article Milon *et al.*, 2000

Figure 2: Structure de l'homohexamère de NDPK du groupe I, vu du dessus, issu de Milon *et al.*, 2000.

Les sous-unités de l'hexamère forment des dimères et des trimères. Les contacts dimériques impliquent l'hélice $\alpha 1$ et le brin $\beta 2$. Les contacts trimériques impliquent les extrémités des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 3$, les résidus C-terminaux 152 à 155 et une large boucle (résidus 99 à 118) appelée boucle Kpn qui connecte l'hélice $\alpha 3$ au brin $\beta 4$ (Dumas *et al.*, 1992).

De plus, toutes les NDPK du groupe I présentent sans exception les résidus essentiels à la catalyse : NXXHG/ASD.

Figure 3 de l'article (Dumas *et al.*, 1992)

Figure 3 : Structure d'un monomère. Tiré de (Dumas *et al.*, 1992).

Les isoformes A et B peuvent se combiner *in vivo* en homohexamères ou hétérohexamères possédant des taux différents de chaque sous-unité (A6, A1B5,..., A5B1, B6) (Gilles *et al.*, 1991).

Les NDPK-C et D présentent une extension N-terminale respectivement de 17 et 33 résidus d'acide aminés par rapport aux NDPK-A et B. Dans le cas de la NDPK-D, cette extension est responsable de sa localisation mitochondriale et est clivée lors de sa translocation dans ce compartiment (Milon *et al.*, 1997).

Aucune structure tridimensionnelle n'a été reportée pour les protéines du groupe II. Le site actif caractéristique d'une NDPK n'est pas conservé, sauf pour Nm23-H6. Ces Nm23

diffèrent de celles du premier groupe de par la considérable variation dans la longueur de leurs extrémités N et C-terminales. Seules les protéines du groupe II sont associées avec d'autres domaines (Boissan *et al.*, 2009), comme les domaines Dpy-30 (40 résidus organisés en deux hélices α , permettant l'implication des Nm23 dans l'élongation des flagelles (Gopal *et al.*, 2012), DM10 (105 résidus dont la fonction précise est encore indéterminée) et thiorédoxine (12 kDa, présente une fonction d'oxydo-réduction des protéines par formation de ponts disulfure entre les cystéines) (Figure 1, page 17).

1.1.3.Mécanisme de l'activité NDPK

L'activité NDPK s'effectue selon un mécanisme de type ping-pong avec phosphorylation du résidu His122 par un nucléoside triphosphate complexé au Mg^{2+} (Gonin *et al.*, 1999). Il y a formation d'un intermédiaire covalent phosphorylé qui va prendre en charge le nucléoside diphosphate et lui transférer le groupement phosphate (cf Figure 4). Il est à noter que chacune de ces étapes est réversible.

Il y a une faible spécificité pour la nature du sucre ou de la base du substrat.

Figure 1 de l'article (Gonin et al., 1999)

Figure 4 : Mécanisme de l'activité NDPK. N_1TP : nucléoside triphosphate 1 ; N_1DP : nucléoside diphosphate 1 ; N_2TP : nucléoside triphosphate 2 ; N_2DP : nucléoside diphosphate 2. (Gonin et al., 1999)

Le site actif apparait comme un modèle préformé et rigide auquel le nucléoside triphosphate se fixe. La conformation de la protéine est très peu modifiée suite à la fixation du substrat (Cherfils *et al.*, 1994). En effet, la structure obtenue par cristallographie de l'enzyme phosphorylée de *Drosophila melanogaster* et de *Dictyostelium discoideum* sur le résidu His122 du site actif ne présente pas de changement majeur de conformation par rapport à la protéine libre (Morera *et al.*, 1995a).

La base est située près de la surface de la protéine, alors que les groupements phosphate et ribose sont localisés plus profondément dans le site actif. Le groupement 3'-OH du sucre présente un intérêt particulier, puisqu'il est impliqué dans un réseau de liaisons hydrogènes avec les résidus du site actif (Asn 119 and Lys16). La modification de ce groupement induit une baisse de l'activité NDPK.

L'implication des résidus Lys12, Thr94, Arg88, Arg105, Tyr52, et Glu129, très conservés au cours de l'évolution, dans la catalyse a été étudiée par mutagenèse dirigée. Il est apparu que les mutants ont tous présenté une activité spécifique diminuée, montrant le rôle de ces résidus dans la catalyse et/ou la fixation du substrat (Morera *et al.*, 1994). Les doubles

rôles des résidus Lys16, Arg109 et Asn119 dans la fixation du substrat et l'assemblage des sous-unités soulignent l'importance du lien fonctionnel entre activité catalytique et structure quaternaire dans les nucléoside diphosphate kinases.

Figure 3 de l'article (Gonin et al., 1999)

Figure 5: Site actif de la NDPK fixée à un substrat dans son état de transition. Le numéro des résidus correspond à celui des NDPK-A et -B tiré de (Gonin *et al.*, 1999).

Ce lien fonctionnel structure oligomérique/catalyse a été approfondi par Mesnildrey *et al.* (1998) qui ont étudié l'activité NDPK du double mutant P100S-N150stop ciblant des résidus impliqués dans les contacts trimérique. Ce mutant d'une NDPK de *Dictyostelium* est dimérique et inactif.

1.1.4. Autres activités

La famille Nm23 est presque universellement conservée au sein des trois domaines de la vie : eubactéries, archées et eucaryotes. Les organismes unicellulaires possèdent un unique gène Nm23 alors que les vertébrés en présentent plusieurs. La multiplication des gènes à travers l'évolution a été accompagnée par des diversifications structurales et fonctionnelles. Plusieurs orthologues Nm23 sont des nucléoside diphosphate kinases, mais certains membres évolués ont perdu cette fonction (Munier *et al.*, 1998) et/ou ont d'autres fonctions (Postel *et al.*, 1993).

D'autres activités, indépendantes ou non de la catalyse intrinsèque de transfert de phosphate, ont été attribuées aux NDPK-A et NDPK-B depuis les années 1990.

1.1.4.1. Liaison à l'ADN et activité de clivage

En 1993, l'analyse de la séquence ADN du facteur de transcription PuF, capable de se fixer et d'activer l'élément nuclease-hypersensitive (NHE) du promoteur du protooncogène c-myc, a révélé une parfaite identité avec le gène nme2 (Postel *et al.*, 1993) et les caractéristiques de liaison à l'ADN ont alors été étudiées. La constante de dissociation est de l'ordre de 10^{-6} M. L'affinité dépend également de la longueur du fragment : la NDPK-B présente une affinité plus élevée pour un fragment de 104 paires de bases que pour un fragment de 50 paires de bases. Il a donc été suggéré que la NDPK-B reconnaît la conformation de l'ADN imposé par les séquences purines/pyrimidines (Postel, 1989). Les résidus impliqués dans la liaison à l'ADN ont été mis en évidence par mutagenèse dirigée : Arg34, Asn69 et Lys135. Il est intéressant de noter d'une part, que les mutants associés sont

pleinement actifs, signifiant que l'activité NDPK est indépendante de la fixation à l'ADN, et d'autre part que deux de ces résidus ne sont pas retrouvés dans l'isoforme A.

Les NDPK-A et B présentent également une activité exonucléasique. Par exemple, NM23-H2 est capable de cliver *in vitro* la séquence NHE (nuclease hypersensitive element), sous forme linéaire ou sous forme superenroulée. Cette activité de clivage de l'ADN se fait via un mécanisme de type glycosylase/lyase DNA et a été attribuée au résidu lysine qui se trouve dans la poche enzymatique. Ce résidu contrôle la formation du complexe covalent avec l'ADN.

1.1.4.2. Rôle de protéine phosphotransférase

Deux fonctions différentes ont été montrées, essentiellement pour les protéines Nm23-H1 et Nm23-H2 :

- sérine/thréonine kinase (Engel, 1995) :

- histidine kinase : elles font partie des rares protéines capables de cette fonction dans le règne eucaryote. Elles peuvent ainsi phosphoryler des protéines comme la protéine KCa3.1, un élément du canal potassique (Srivastava *et al.*, 2006). Il semble que le nombre de substrats identifiés soit limité probablement à cause de la nature instable du résidu phosphoaspartate.

1.2. Rôles métaboliques associés à l'activité NDPK

Lacombe *et al.* (2000) ont fait état des différents rôles métaboliques des NDPK dans les cellules de mammifères :

- utilisation de l'ATP comme donneur pour la synthèse des NTPs non-adényliques requis pour la synthèse des acides nucléiques et plusieurs intermédiaires métaboliques importants tels que l'UDP-glucose pour la synthèse de glycogène, le CTP pour la synthèse de phospholipides, le GTP pour la synthèse protéique...

- catalyse de la transphosphorylation entre le GTP produit par le cycle de Krebs et l'ADP

- fournir le GTP pour la signalisation via les protéines G et la polymérisation des tubulines.

Cependant, la multiplicité des isoformes, leur localisation cellulaire préférentielle ainsi que leurs partenaires d'interaction différents, suggèrent que les NDPK présentent des rôles plus spécialisés que ceux cités.

1.3.Rôles physiologiques

La présence des NDPKs et leur homologues dans presque chaque organisme vivant, depuis les bactéries jusqu'aux mammifères, suggère leur importance pour le fonctionnement normal d'une cellule. En effet, les NDPKs sont impliquées dans une multitude de processus cellulaires physiologiques et pathologiques, via des mécanismes encore mal connus. Leurs implications dans ces mécanismes de la cellule ont été soulevées par de nombreuses techniques différentes : knock-out de gènes chez la souris (Postel *et al.*, 2009), surexpression ou d'extinction des gènes (Ishijima *et al.*, 1999), expression et localisation dans des types de cellules variés (Bosnar *et al.*, 2009), mise en évidence de partenaires d'interaction préférentiels par différentes techniques comme le double hybride ou l'immunoprécipitation (Lacombe *et al.*, 2009; Rochdi *et al.*, 2004; Roymans *et al.*, 2002)...

D'un point de vue global, les NDPKs sont désormais connues pour jouer un rôle dans les événements majeurs de la cellule. La liste qui suit et les exemples associés ne sont qu'un aperçu de l'étendue des implications biologiques des Nm23 :

- l'apoptose : la NDPK-B est capable d'interagir avec Diva, un membre de la famille Bcl-2 impliqué dans l'apoptose (Kang *et al.*, 2007).
- la prolifération cellulaire : l'inhibition de l'expression de nme1 par des ARN anti-sens conduit à une baisse de la prolifération cellulaire (Cipollini *et al.*, 1997)
- la différenciation : la surexpression du gène nme3 conduit à l'arrêt de la différenciation de granulocytes (Venturelli *et al.*, 1995)
- l'adhésion cellulaire : la surexpression de la NDPK-A dans des cellules CAL 27 (oral squamous cell carcinoma of the tongue) provoque une augmentation de l'adhésion de ces cellules (Bago *et al.*, 2009)
- l'endocytose : la NDPK-A est impliquée dans l'endocytose médiée par la dynamine via un recrutement par une forme active de Arf6, (Arf6-GTP) (Palacios *et al.*, 2002).

Le rôle des isoformes du groupe II est plus flou et n'a jamais été pleinement étudié.

Malgré leurs rôles dans la physiologie normale des cellules, les NDPKs ont été et sont encore largement étudiées pour leur implication dans les processus de cancérisation et leur activité anti-métastatique.

1.3.1.NDPKs et cancer

Le gène *nme* est le premier gène anti-métastatique découvert, originellement remarqué par criblage dans une lignée de mélanome de souris (Steeg *et al.*, 1988). Un lien fonctionnel a ensuite été établi plusieurs années après, par transfection de *nme* dans une lignée de mélanome murin, réduisant la prolifération métastatique mais n'affectant pas la taille de la tumeur primaire (Leone *et al.*, 1991). Depuis, un grand nombre d'études ont été menées pour valider ou non ce lien.

Globalement, les données publiées suggèrent un double lien entre *nme1/2* et la cancérogenèse. Lors des premiers stades cancéreux, il y aurait surexpression de *nme1* (et *nme2*) dans les tumeurs solides humaines, suggérant un rôle favorable de ces protéines sur les étapes de cancérisation. Au contraire, dans les stades plus avancés, la perte de l'expression de *nme1* est corrélée avec le pouvoir métastatique. En effet, *nme1* empêche la formation de métastases dans des lignées cellulaires de cancer du sein, de mélanome et de cancer de la prostate. D'un autre côté, une corrélation directe avec l'apparition de métastases est observée dans d'autres types de cancer comme le neuroblastome ou le cancer pancréatique.

Dans la plupart des études, l'expression de *nme2* ne peut être reliée à aucun paramètre clinicopathologique, bien qu'occasionnellement, une corrélation significative entre l'apparition de métastases, dans le cancer de l'ovaire et de l'endomètre, et l'expression de NDPK-B ait été reportée. Il est intéressant de noter que la NDPK-B est excrétée dans le cancer du sein. Cependant, certaines études montrent que la transfection d'ADN codant de *nme2* dans plusieurs lignées cellulaires dont la lignée SCC (oral squamous cell carcinoma), induit une diminution de leur potentiel métastatique (Miyazaki *et al.*, 1999).

Un niveau d'expression élevé de *nme3* a été observé dans plusieurs lignées de cellules tumorales de leucémies myéloïdes chroniques. Des études sur le gène *nme3/DR-nm23* ont montré que le produit NDPK-C est impliqué dans le développement de tumeur, probablement en influençant les étapes de différenciation de certains types de tumeur ou en induisant l'apoptose de certaines cellules transformées (Miyazaki *et al.*, 1999).

La NDPK-D est surexprimée dans la majorité des cancers de l'estomac et du colon, ce qui la relierait au développement de tumeurs (Seifert *et al.*, 2005).

Plus de 200 études ont corrélées l'expression *nme* ou la perte d'hétérozygotie (LOH) au locus *nme1/2* avec des paramètres clinico-pathologiques comme l'apparition de métastases ou la survie des patients.

Il est désormais admis que l'activité antimétastatique est indépendante de l'activité NDPK, puisque la surexpression du mutant inactif Nm23-H1 H118C empêche la formation de métastases (MacDonald *et al.*, 1993). Cependant, deux mutations spontanées de nme1 résultent en la perte de l'activité anti-métastatique : S120G, fréquemment observé dans les neuroblastomes agressifs et P96S qui correspond à la mutation killer of prune (Kpn) chez *Drosophila*. De manière intéressante, ces deux mutations inactivent l'activité de phosphorylation. La phosphorylation de la protéine KSR (kinase suppressor of ras) est réalisée par nme1, suggérant le lien entre activité anti-métastatique et suppression des signaux de croissances induits par ras.

Nm23-H1 et Nm23-H2 répriment toutes les deux la transcription via des interactions avec des éléments "paranémiques" dans la région promotrice du gène PGF-A (platelet-derived growth factor-A) (Kaetzel, 2003; Ma *et al.*, 2002). La répression de ce gène oncogénique et promoteur de métastases (Anan *et al.*, 1996) est également consistant avec l'activité anti-métastatique de ces deux NDPKs.

1.3.2.NDPKs et autres pathologies

Bien que les NDPK aient été majoritairement étudiées pour leur importance dans les cancers et la formation de métastases, leur implication dans d'autres pathologies a néanmoins été signalée.

En effet, les niveaux d'expression des NDPK-A et B semblent également modifiés dans des pathologies de types Alzheimer et syndrome de Down (Kim *et al.*, 2002). Il a été proposé que la modification oxydative de ces NDPK puisse conduire à une diminution de leur activité et influencer par conséquent plusieurs fonctions dans les maladies neurodégénératives.

1.4.NDPKs et membranes

1.4.1.NDPK-A et NDPK-B

Les NDPK-A et B ont toutes les caractéristiques des protéines cytosoliques, sans segment hydrophobe exposé ou motif de fixation à la membrane. Pourtant, la purification et la caractérisation d'une NDPK des membranes plasmiques de foie de rat ont révélé qu'elle était identique à la protéine soluble. En effet, les NDPKs cytosoliques sont associées avec les membranes de plusieurs compartiments intracellulaires (endosomes, membranes du réticulum endoplasmique, phagosomes...) et avec la membrane plasmique.

Dans certains cas, le recrutement des NDPK-A et/ou B à la membrane a été attribuée à l'interaction avec leurs partenaires et non à une fixation directe des protéines à la membrane (Palacios *et al.*, 2002; Rochdi *et al.*, 2004).

Bien que des puces à lipides suggèrent une interaction avec des phospholipides de type PIP₂ (Mitchell *et al.*, 2009) et Schlattner et collaborateurs, montrent une affinité très faible pour des membranes contenant de la cardiolipine, mesurée par résonance plasmonique de surface sur bicouches supportées (Tokarska-Schlattner *et al.*, 2008), une interaction directe de la NDPK-A avec les membranes n'a jamais été clairement démontrée. Au niveau de la membrane plasmique, la NDPK-A est impliquée dans l'endocytose médiée par la dynamine et est recrutée par une forme active de Arf6 (Arf6-GTP) (Palacios *et al.*, 2002).

Baughman *et al.*, ont montré en 2008, l'importance de la NDPK-B et de son interaction avec les membranes dans la formation du réseau réticulum endoplasmique (Baughman *et al.*, 2008). En effet, le traitement alcalin permettant l'extraction des protéines périphériques, dont la NDPK-B, induit une rétraction du réseau réticulum endoplasmique. L'ajout de NDPK-B est suffisant pour régénérer une extension du réseau. De plus, il a été montré la capacité de la NDPK-B à fixer les membranes via une interaction directe avec des liposomes multilamellaires contenant des phospholipides tels que l'acide phosphatidique ou les phosphoinositides phosphorylés de type PIP₂. Une constante de dissociation de la NDPK-B pour le PIP₂ a été calculée et est de l'ordre de 30 µM. Les auteurs précisent cependant que cette valeur est mal estimée, puisque les mesures ont été réalisées avec des liposomes multilamellaires (la quantité de lipides accessibles est plus basse par rapport à la quantité de lipides totaux que celle de liposomes unilamellaires).

Cette interaction NDPK-B/liposomes permet la formation d'un large réseau de liposomes mesuré par diffusion de la lumière et visualisé par microscopie de lumière blanche. Le mutant K56E, R58E est incapable de se fixer aux liposomes, ce qui souligne l'importance de ces résidus dans la fixation de la NDPK-B aux membranes.

Au niveau de la membrane plasmique, les NDPK-A et B influenceraient un certain nombre de fonctions biologiques (comme l'activation de récepteurs et la désensibilisation par des agonistes, l'endocytose médiée par la dynamine, l'adhésion médiée par l'intégrine...) par interaction avec des partenaires particuliers et spécifiques à chaque isoforme. Par exemple, la microscopie d'immunofluorescence sur des cellules HEK293 a révélé la capacité de la NDPK-B à interagir avec le récepteur thromboxane A₂ lorsqu'il est stimulé. Cette interaction conduit à l'internalisation du récepteur (Rochdi *et al.*, 2004). La NDPK-B active par phosphorylation, grâce à son activité histidine kinase, le canal ionique KCa 3.1 (Srivastava *et*

al., 2006). La NDPK-B interagit également avec l'intégrin cytoplasmic domain-associated protein 1 α (ICAP-1 α) avec qui elle influencerait l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines (Fournier *et al.*, 2003).

Des études sur des systèmes biomimétiques de type liposomes, en présence de concentrations croissantes de nucléosides di ou triphosphates différents, ont montré récemment que la fixation de la NDPK-B de souris semblait régulée par son cycle catalytique et que c'est l'enzyme sous forme phosphorylée qui aurait le plus d'affinité pour la membrane (Mitchell *et al.*, 2009). En effet, alors que des concentrations d'ATP et de GTP de l'ordre du micromolaire augmentent la fixation de la protéine, l'augmentation de ces concentrations jusqu'au millimolaire conduisent à la désorption de la NDPK-B. L'ADP, quelle que soit sa concentration, donne le même résultat (l'enzyme est décrochée de la membrane).

Un modèle d'interaction avec les lipides a alors été proposé et est détaillé dans la Figure 6.

Figure 6 de l'article (Mitchell *et al.*, 2009)

Figure 6 : Schéma du transfert de phosphate catalysé par la NDPK en présence de phospholipides (notation de Cleland). E: enzyme libre; E·N1TP: complexe enzyme-substrat (nucléoside triphosphate1); E~P·N1DP: complexe enzyme phosphorylée-produit (nucléoside diphosphate1) ; E~P: intermédiaire, enzyme phosphorylée ; E~P·N2DP: complexe enzyme phosphorylée-substrat (nucléoside diphosphate2); E·N2TP: complexe enzyme-substrat (nucléoside triphosphate2) ; E·NDP, E~P·NTP: complexes formés à hautes concentrations de NDP ou NTP; E~P·Lipid: complexe proposé enzyme phosphorylée-phospholipide(s). (Mitchell *et al.*, 2009)

Cette interaction ne nécessite aucune autre protéine additionnelle, bien qu'il soit probable qu'elle soit renforcée par d'autres composants membranaires.

1.4.2.NDPK-D

Milon *et al.*, ont extrait des membranes internes de mitochondries et ont montré la présence de l'isoforme mitochondriale de la NDPK, NDPK-D, dans la fraction non soluble. Elle est donc associée à la membrane interne de la mitochondrie.

Plus récemment, il a été montré que cette isoforme est capable de se fixer sur des liposomes contenant de la CL (Tokarska-Schlattner *et al.*, 2008). De par son état oligomérique et du fait que sa séquence ne présente aucun peptide d'attachement membranaire, il en a été déduit que le produit de nm23-H4 n'est pas une protéine membranaire intrinsèque et pourrait être relarguée des membranes par traitement alcalin (Milon *et al.*, 2000).

Les mécanismes de fixation de la NDPK-D à la membrane sont encore mal connus. Cependant, des expériences de mutagenèse dirigée couplées à des mesures de spectroscopie de résonance plasmonique de surface sur des liposomes modèles contenant des

phospholipides anioniques, ont montré l'implication de la triade Arg89-Arg90-Lys91 de la NDPK-D dans l'interaction avec la cardiolipine.

Grâce à sa structure oligomérique symétrique, la NDPK-D est capable de former des agrégats de liposomes contenant de la CL, mis en évidence par mesures de diffusion de la lumière.

Du fait que la NDPK-D et la porine VDAC sont distribuées de façon similaire parmi les fractions, il a été fortement suggéré que la NDPK-D serait associée, comme la porine, à des sites de contacts entre les membranes externes et internes de la mitochondrie. La fixation de la NDPK-D à la membrane interne pourrait contribuer au remodelage de la structure mitochondriale (Milon *et al.*, 2000; Schlattner *et al.*, 2009).

Figure 9 de l'article (Tokarska-Schlattner *et al.*, 2008)

Figure 7 : Modèle fonctionnel d'interaction de la NDPK-D avec les membranes mitochondriales. Tiré de (Tokarska-Schlattner *et al.*, 2008)

Un transfert de lipides fluorescents depuis un liposome donneur vers un liposome accepteur, accéléré par la NDPK-D a été mesuré, et implique principalement la cardiolipine. Les auteurs excluent une fusion lipidique des vésicules, par mesure de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET). Il en a été déduit que la NDPK-D pouvait être impliquée dans l'apoptose, en induisant le transfert de la cardiolipine depuis la membrane interne vers la membrane externe de la mitochondrie.

Etant donné que le niveau d'expression de la NDPK-D varie considérablement selon les différents types cellulaires, et que l'enzyme est présente dans les sites de contact même dans les cellules qui ne sont pas en apoptose, un mécanisme de régulation de ce transfert lipidique, mettant en cause la NDPK-D, est à envisager (Erand *et al.*, 2007).

De plus, la NDPK-D pourrait jouer un rôle au niveau de la formation du pore de transition de perméabilité (PTP) composé entre autres de VDAC et ANT, comme indiqué précédemment. Ainsi cette protéine pourrait être impliquée à plusieurs niveaux dans le processus de mort cellulaire programmée (Lacombe *et al.*, 2009).

Chapitre 2 : Les membranes biologiques

Les membranes biologiques sont universellement définies par un assemblage complexe de lipides, de protéines et d'oses, et sont à l'origine d'un grand nombre de fonctions

essentielles pour la cellule. Elles sont des frontières qui séparent l'intérieur et l'extérieur des cellules et des organites cellulaires: elles assurent l'intégrité de la cellule et des organites, sont un lieu de conflits et d'échanges avec l'environnement, assurent un passage sélectif des molécules, sont permanentes mais déformables, et régulent beaucoup de fonctions physiologiques comme la transduction du signal, les transports vésiculaires...

En 1972, Singer et Nicholson proposent le modèle de la mosaïque fluide et décrivent la membrane comme une bicouche lipidique fluide dans laquelle sont insérées des protéines, dont certaines peuvent même la traverser de part en part : ce sont les protéines intégrales ou intrinsèques. A celles-ci s'ajoutent les protéines périphériques, associées à la membrane par différents modes d'interaction : interactions électrostatiques ou plus spécifiques, ou par des ancrages (chaînes carbonées, séquences d'acides aminés hydrophobes). Aujourd'hui ce modèle est obsolète puisqu'il est basé sur la diffusion libre des protéines (Figure 8).

Les progrès accomplis depuis, notamment au niveau de l'organisation dynamique des constituants, montrent que la distribution des lipides et des protéines n'est pas aléatoire et suggèrent, pour rendre compte de la spécificité et de l'efficacité des fonctions, la présence de nombreux domaines fonctionnels (Engelman, 2005).

Figure 1 de l'article (Engelman, 2005).

Figure 8 : Modèles généraux des membranes. a. Modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicholson. b. Modèle mis à jour (Engelman, 2005).

En effet, il est généralement admis désormais que l'organisation des membranes, et particulièrement de la membrane plasmique, est régie par des associations préférentielles entre les différentes molécules lipidiques et protéiques des membranes. Ces associations peuvent être à l'origine de la formation de plateformes fonctionnelles impliquées dans des réactions chimiques, des processus d'ancrage, de transport ou de signalisation.

2.1. Les différentes classes de lipides membranaires

Il existe 4 classes principales de lipides membranaires, classés selon la structure de leur squelette carboné (atomes de carbones chaînés, cycliques, etc).

2.1.1. Les phospholipides

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles, composées d'un squelette glycérol sur lequel est greffé (Figure 9):

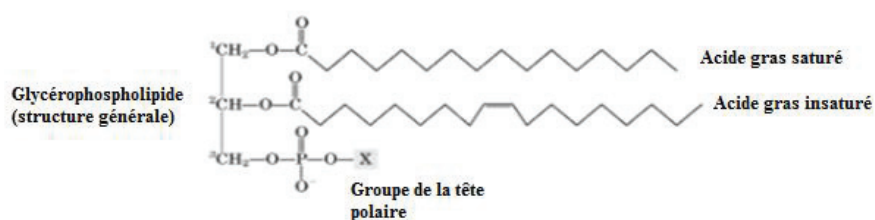
-une tête polaire composée d'un groupement phosphate lié à un composé hydroxylé dont la nature définit le phospholipide.

-deux chaînes acyles dont la longueur et le nombre d'insaturations sont variables.

A pH neutre, le groupement phosphate des phospholipides présente une charge négative. Ainsi, la charge nette des phospholipides varie seulement selon la nature du groupement hydroxyle porté (Figure 9).

La tête polaire peut alors :

- ne porter aucune charge électrique nette (phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine) : puisque la charge apportée par le groupement hydroxylé est positive.
- porter une charge nette négative soit parce que le groupement hydroxylé n'est pas chargé (phosphatidylinositol, phosphatidylglycérol) soit parce qu'il est globalement neutre (phosphatidylsérine).



Phospholipide	X	Formule de X	Charge nette à pH 7
Acide phosphatidique	-	-H	-1
Phosphatidyléthanolamine	Ethanolamine	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	0
Phosphatidylcholine	Choline	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	0
Phosphatidylsérine	Sérine	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)-\text{NH}_2$	-1
Phosphatidylglycérol	Glycérol	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$	-1
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	myo-inositol 4,5-bisphosphate		-4
Cardiolipin	Phosphatidylglycérol		-2

Figure 9 : Modèle moléculaire d'un phospholipide.

Le lipide membranaire le plus répandu est la phosphatidylcholine (PC) qui représente 50% des phospholipides cellulaires. C'est un phospholipide zwitterionique, avec deux chaînes acyles dont une généralement insaturée, ce qui induit une courbure au niveau des chaînes acyles de la molécule. La PC présente une forme cylindrique, ce qui lui donne la capacité de former des organisations lamellaires (Gruner *et al.*, 1985; Israelachvili *et al.*, 1980).

Dans la même catégorie des glycérophospholipides s'inscrit la phosphatidyléthanolamine (PE), qui compte pour 20% des lipides dans la majorité des membranes. Ce lipide est aussi zwitterionique, mais la tête polaire est plus petite par rapport aux chaînes acyles ce qui donne une forme conique à la molécule. Ceci induit un stress dans la bicouche et une tendance à adopter des phases hexagonales ou des courbures négatives (Gruner *et al.*, 1985; Israelachvili *et al.*, 1980).

D'autres glycérophospholipides à relevance physiologique sont chargés négativement à pH physiologique comme la phosphatidylsérine (PS) ou le phosphatidylinositol (PI). La PS, normalement présente au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique, apparaît à la surface de la cellule pendant l'apoptose. Au niveau des plaquettes, elle joue aussi un rôle pendant la coagulation (Lentz, 2003) .

Le PI sert de base dans la production des seconds messagers (DAG et PIP). PI peut être phosphorylé sur les positions 3, 4 et 5 du cycle inositol, ce qui donne lieu à la formation de plusieurs poly-phosphoinositides de faible abondance. Ces lipides sont trouvés dans le feuillet interne de la membrane plasmique, servent de sites de reconnaissance pour des protéines cytoplasmiques spécifiques (moesine, ezrine, taline, etc...des protéines qui font le lien entre membrane plasmique et cytosquelette (Ben-Aissa *et al.*, 2012)) et agissent comme des seconds messagers modulant l'activité de certaines protéines membranaires.

Par exemple, plusieurs canaux et transporteurs ioniques de la membrane plasmique requièrent la présence du PIP₂ pour être fonctionnels : Hilgemann et Ball ont mesuré les courants ioniques induits par l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ et le canal KATP, deux transporteurs de la membrane plasmique, dans des fragments membranaires et ont montré que l'incubation des membranes avec une phospholipase C spécifique des phosphoinositides inhibait les transports ioniques (Hilgemann et Ball, 1996).

La Figure 10 résume les principales fonctions du PIP₂.

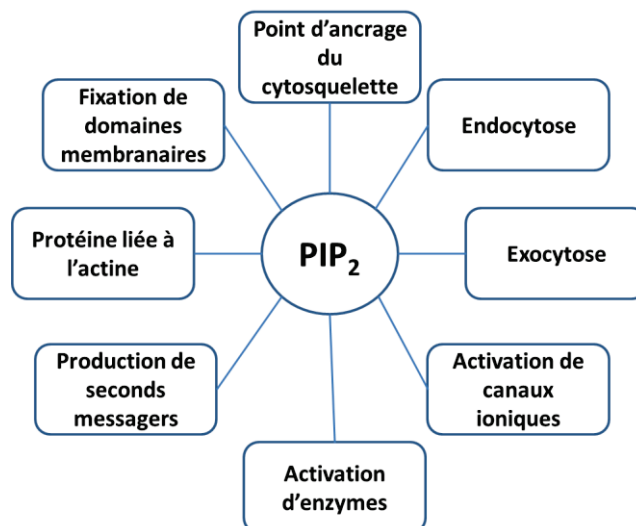


Figure 10 : Les fonctions du PIP₂.

2.1.2. Les glycolipides

Les glycolipides jouent un rôle dans la reconnaissance moléculaire au niveau des membranes cellulaires. Les glycolipides peuvent jouer le rôle de récepteurs pour des substances extracellulaires. Ainsi la toxine cholérique est captée par un glycolipide, le GM1, à la surface de la cellule intestinale (Wernick *et al.*, 2010). Ils dérivent du glycérol estérifié en positions 1 et 2 par un acide gras et en position 3, ils sont liés par une liaison glycosidique à des sucres tels que le galactose.

2.1.3. Les sphingolipides

Les sphingolipides (SL) sont des lipides complexes, présents entre autres dans les membranes plasmiques où ils jouent un rôle important dans la transmission du signal, et la reconnaissance des cellules. Ils résultent de l'amidification d'un acide gras sur une sphingosine. Sur la fonction alcool primaire de la sphingosine, peuvent s'ajouter différents substituants. En fonction de la nature du substituant, on distingue notamment les céramides, les phosphosphingolipides et les glycosphingolipides. Les sphingomyélines, des phosphosphingolipides, sont les principaux constituants de la gaine de myéline. Ils sont formés par l'assemblage de la sphingosine liée à un acide gras par une liaison amide, et de la choline, liée à la sphingosine par une liaison phosphodiester.

2.1.4. Les stérols

Un stérol est un lipide possédant un noyau de stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle. Les stérols sont considérés comme une sous-classe des stéroïdes.

Le cholestérol, l'un des stérols les plus communs et répandus, est un précurseur de vitamines et d'hormones stéroïdiennes liposolubles (Hanukoglu, 1992). Ce lipide est un élément indispensable dans la construction et le maintien de l'intégrité membranaire ; il module la fluidité membranaire (Yeagle, 1991). Le cholestérol réduit la perméabilité de la membrane plasmique aux solutés neutres, aux protons et aux ions sodium. Il a également été retrouvé impliqué dans la signalisation cellulaire, en participant à la formation des rafts lipidiques dans la membrane plasmique (Incardona et Eaton, 2000). Le cholestérol est un précurseur de plusieurs voies de synthèse. Dans le foie, il est converti en bile qui va permettre la solubilisation des graisses et aide à l'absorption intestinale.

2.2.Composition des membranes biologiques

La variabilité des têtes polaires et des chaînes aliphatiques permet l'existence de plus de 1 000 espèces différentes de lipides dans les cellules eucaryotes (Sud *et al.*, 2007). De façon intéressante, les phospholipides et les stérols ne sont pas distribués de manière homogène au sein des organites des mammifères. De plus, la distribution asymétrique des composés lipidiques entre feuillet exposé au cytoplasme (phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine) et feuillet exposé au lumen (sphingomyéline et glycosphingolipides) est retrouvée dans tous les organites sauf le réticulum endoplasmique (RE).

La membrane plasmique est enrichie en sphingomyéline et en stérols par rapport aux membranes des organites (Figure 11). Ces molécules sont connues pour résister au stress mécanique. Bien que la membrane plasmique ne soit impliquée dans aucune synthèse des lipides structuraux qui la composent, elle est le lieu de nombreuses réactions de synthèse ou de dégradation des lipides impliqués dans des cascades de signalisation.

Le réticulum endoplasmique est le lieu de synthèse des lipides de structure (cholestérol, céramides qui sont des précurseurs de sphingomyéline...) qui, dès leur formation, sont exportés vers les autres organelles. Le RE présente donc des quantités faibles en SL et cholestérol, par conséquent la membrane est faiblement compactée. Cependant, le RE contient les taux les plus élevés de PC, PE et PI.

L'appareil de Golgi est le deuxième organite impliqué dans la synthèse de lipides, en particulier des SL destinés au transport vésiculaire vers la membrane plasmique. La composition lipidique des membranes de Golgi est riche en glycosphingolipides (GSL).

Les endosomes tardifs ont un contenu en PS et en cholestérol diminué par rapport à la membrane plasmique. Cependant, ces compartiments contiennent des niveaux élevés de BMP

(bis(monoacylglycérol)phosphate), lipide particulier qui est impliqué dans différents processus cellulaires comme la fusion membranaire, l'hydrolyse des SL, ou la formation des vésicules.

Figure 2 de l'article (Van Meer *et al.*, 2008).

Figure 11 : Synthèse lipidique et composition des membranes cellulaires. Les données (graphes) sont exprimées en termes de pourcentages de phospholipides totaux chez les mammifères (bleu) et la levure (bleu clair) et montrent le ratio molaire du cholestérol (CHOL ; mammifères) et ergostérol (ERG ; levure) sur phospholipides. La figure montre le site de synthèse des phospholipides majeurs (bleu) et des lipides impliqués dans les voies de signalisation et de reconnaissance de l'organite (rouge). Cer : céramides ; GalCer : galactosylcéramide ; TG : triacylglycérol ; SM : sphingomyéline ; GSLs : glycosphingolipide ; ISL : sphingolipide inositol (levure) ; DAG : diacylglycérol ; PL : phospholipid ; PI(3,2)P2 : phosphatidylinositol-(3,5)-bisphosphate ; PI(3,4,5)P3 : phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate ; PI4P : phosphatidylinositol-4-phosphate ; R : remaining lipids ; S1P : sphingosine-1-phosphate ; Sph : sphingosine. (Van Meer *et al.*, 2008).

Les tableaux suivants donnent d'une part les pourcentages en masse des lipides retrouvés au niveau de la membrane des organites et de la membrane plasmique et d'autre part les pourcentages des chaînes acyles retrouvés dans les cellules.

	Membrane plasmique		Réticulum endoplasmique	Golgi	Lysosome	Membrane nucléaire
	erythrocytes	Foie de rat				
PC	20	18	48	25	23	44
PE	18	12	19	9	13	17
PS	7	7	4	3		4
PI	3	3	8	5	6	6
sphingomyéline	18	12	5	7	23	3
CL	-	-	-	-	5	1
Glycolipides	3	8	traces	0	traces	traces
Cholestérol	20	19	6	8	14	10
Autres	11	21	10	43	16	15

Tableau 3 : Composition lipidique en pourcentage massique des différentes membranes. (Jamieson et al., 1977).

16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:2	20:4	20:5	22:4	22:6
20,2	3,2	21,3	27,5	2,6	N.D	0,3	8,9	ND	1,7	3,7

Tableau 4 : Pourcentages d'acides gras dans les cellules endothéliales. (Spector et Yorek, 1985).

2.2.1. Les rafts

Les rafts sont des microdomaines de la membrane plasmique, hautement organisés en termes de lipides (Figure 12). Les rafts sont enrichis en cholestérol, et en lipides saturés de type sphingolipides. Ces structures organisées sont très dynamiques et présentent des dimensions de l'ordre de 20-200 nm et un temps de vie allant de 10^{-2} à 10^3 s. Les microdomaines contiennent souvent des protéines (protéines transmembranaires, protéines à ancre GPI...), et leur distribution spatiale peut dépendre du couplage de ces protéines avec le cytoquelette.

Figure 13 du livre (Alberts *et al.*, 2002).

Figure 12: Les constituants des radeaux lipidiques (Alberts *et al.*, 2002).

Bien que les radeaux lipidiques n'aient jamais été observés *in vivo*, il existe des preuves indirectes pour supporter l'existence des rafts (Lenne *et al.*, 2006; Pralle *et al.*, 2000). La formation des microdomaines lipidiques reste cependant largement débattue au sein de la communauté scientifique.

Il existe plusieurs scénarios théoriques qui proposent (1) que la présence de microdomaines lipidiques est une propriété inhérente de la membrane à l'équilibre thermodynamique, ou (2) que la formation, la structure et la dynamique des microdomaines sont contrôlées par le recyclage des lipides (Figure 13) (Fan *et al.*, 2009).

Figure 1 de l'article (Fan *et al.*, 2009)

Figure 13 : Théories de formation des rafts (Fan *et al.*, 2009)

Rajendran et Simons (2005) ont fait état des processus cellulaires impliquant les rafts (Figure 14). D'un point de vue global, les radeaux lipidiques jouent un rôle dans le trafic membranaire, la signalisation (plus particulièrement la signalisation de l'immunité), la polarisation de cellules épithéliales et la pénétration de virus.

Figure 1 de l'article (Rajendran et Simons, 2005)

Figure 14: Les fonctions associées aux radeaux lipidiques. Tiré de (Rajendran et Simons, 2005)

2.2.2. La particularité des membranes mitochondriales

La mitochondrie du grec *mitos*, fil et *chondros*, grain, est une structure intracellulaire dynamique dont les dimensions sont de 1-2 à 10 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large. Elle est délimitée par deux bicouches de phospholipides qui sont (Comte *et al.*, 1976) :

- la membrane externe qui contient 40% de lipides, dont environ 40% de phosphatidylcholine (PC), 27% de phosphatidyléthanolamine (PE), 9% de phosphatidylinositol (PI), 7% cholestérol, et 4% de cardiolipine (CL).
- la membrane interne qui a une composition lipidique très différente : 35% de PC, 26% de PE, 18% de CL et pas de cholestérol.

Le Tableau 5 donne les pourcentages en poids des différents acides gras présents dans les membranes et au niveau des sites de contact mitochondriaux.

Acides gras	Membrane externe (%)	Sites de contact		Membrane interne (%)
		Membrane externe (%)	Membrane interne (%)	
C12:0	0,1 ± 0,01	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C14:0	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,05	0,4 ± 0,06	0,1 ± 0,01
C16:0	36,3 ± 1,1	30,3 ± 2,0	29,8 ± 1,4	28,2 ± 1,2
C16:1	0,5 ± 0,05	3,0 ± 0,05	6,3 ± 0,1	2,1 ± 0,05
C18:0	20,5 ± 1,6	18,7 ± 1,0	14,0 ± 0,9	15,6 ± 1,0
C18:1	18,0 ± 1,3	17,8 ± 1,2	13,7 ± 1,0	16,8 ± 1,3
C18:2	16,6 ± 0,9	21,5 ± 1,3	21,8 ± 0,7	23,5 ± 0,7
C18:3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
C20:3	0,5 ± 0,02	0,1 ± 0,01	1,0 ± 0,05	1,2 ± 0,05
C20:4	7,1 ± 0,2	8,3 ± 0,5	12,9 ± 0,2	12,4 ± 0,9
Rapport saturés/insaturés	1,33	0,97	0,8	0,78

Tableau 5 : Composition en poids des acides gras présents dans les membranes et les sites de contact des mitochondries.

Outre ces phospholipides, il existe d'autres constituants des membranes internes mitochondriales. Les lipides CDP-DAG, phosphatidylglycérol (PG) phosphate (PGP) sont des intermédiaires importants pour la synthèse des espèces lipidiques mais ne sont pas retrouvés en grandes quantités dans la mitochondrie en conditions normales. Cependant, le PG, qui s'accumule dans la membrane en absence de CL synthase, peut partiellement compenser plusieurs des fonctions assurées par la CL (Jiang *et al.*, 2000). Dans les cellules de mammifères, les mutations de la PGP synthase empêchent la production de PG et CL, ce qui résulte en une mitochondrie altérée du point de vue fonctionnel et structural (Ohtsuka *et al.*, 1993a; Ohtsuka *et al.*, 1993b).

Le rôle physiologique de la mitochondrie est primordial, puisqu'il est impliqué dans le stockage de l'énergie sous forme d'ATP, par le processus de phosphorylation oxydative. La mitochondrie tient également une place importante dans la mort cellulaire programmée, notamment marquée par la libération du cytochrome *c* fixé à un phospholipide particulier, la cardiolipine.

2.2.2.1. Rôle de la cardiolipine dans la mitochondrie

Etant donné que la cardiolipine est un lipide spécifique de la mitochondrie, il semble logique de penser que sa fonction biologique dans cet organite est fondamentale. La cardiolipine, ou diphosphatidylglycérol, est un lipide spécifique des membranes impliquées dans la génération d'énergie, notamment les membranes des bactéries, des chloroplastes et au niveau de la membrane interne des mitochondries. Ce phospholipide possède quatre chaînes

acyles et une tête polaire diphosphatidylglycérol. Il présente théoriquement deux charges négatives (cf Figure 15). Cependant, en solution à pH neutre, la cardiolipine ne présenterait qu'une seule charge, car un proton est piégé dans une structure formée par les deux phosphates et le groupement hydroxyl central (Schlame, 2008). Il apparaît que la CL induirait la formation de phase H_{II} au niveau des sites de contact, où elle est enrichie (Ardail *et al.*, 1990).

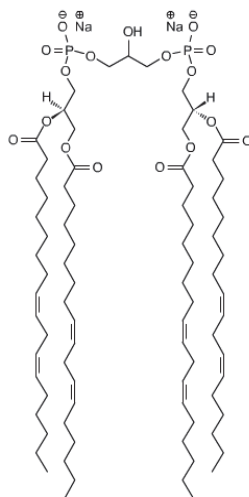


Figure 15: Structure de la cardiolipine.

La CL est impliquée dans de nombreux processus au sein de la mitochondrie. La Figure 16 résume ces processus. Elle est un élément essentiel dans des processus tels que la translocation de l'ATP/ADP via son interaction avec l'ANT (transporteur des nucléotides adényliques). Elle est aussi impliquée dans la transduction d'énergie puisqu'elle interagit entre autres avec les complexes III (cytochrome bc1) et IV (cytochrome c oxydase) de la chaîne respiratoire. Il a été montré que la cardiolipine stabilise leur structure quaternaire (Zhang *et al.*, 2005).

Figure 4 de l'article (Osman *et al.*, 2011).

Figure 16: Rôle de la CL dans les processus mitochondriaux. Extrait de (Osman *et al.*, 2011). La CL est en rouge. A. Implication de la CL dans les mécanismes de production d'énergie. B implication de la CL dans les processus de transport protéique. C. CL pendant l'apoptose : 1) Le cytochrome c se fixe à la membrane interne via à la CL. 2) Relarguage du cytochrome c sous l'oxydation de la CL. 3) Pro caspase-8 (pro8) se fixe à la surface des mitochondries, s'oligomérisent, et s'autoclivent de façon CL-dépendante. 4 et 5) Le clivage de Bid en tBid par la caspase-8. 6) PLS3 permet l'export de la CL depuis la membrane interne vers la membrane externe de la mitochondrie. D. La CL affecte la fusion des membranes mitochondriales.

Plusieurs études indépendantes ont révélé l'importance de la CL dans l'assemblage et la fonction des TIM (translocase of the inner membrane) et TOM (translocase of the outer membrane). Ces protéines hétéroooligomériques permettent d'importer la vaste majorité des protéines mitochondriales encodées au niveau du noyau (Schmidt *et al.*, 2010b).

Ce lipide unique joue, en outre, un rôle actif dans plusieurs étapes de l'apoptose. La CL située dans la membrane externe de la mitochondrie assure un point d'ancrage et une plateforme d'activation pour la caspase-8 (Gonzalvez et Gottlieb, 2007). L'insertion de la protéine Bax et son oligomérisation sont facilitées en présence de CL (Lucken-Ardjomande *et al.*, 2008; Lutter *et al.*, 2000a). Une autre de ces étapes est l'association/dissociation du cytochrome *c* de la cardiolipine. En effet, ce lipide permet l'ancrage direct du cytochrome *c* à la membrane interne de la mitochondrie et donc sa rétention dans l'espace intermembranaire en l'absence de stimuli apoptotiques (Choi *et al.*, 2007; Sinibaldi *et al.*, 2008). L'interaction entre le cytochrome *c* et la CL est affaiblie sous l'effet de la peroxydation des chaînes acyles insaturées de la CL (oxydation des lipides insaturés, soit par des espèces radicalaires de l'oxygène, soit catalysée par des enzymes) (Nomura *et al.*, 2000). Le relargage du cytochrome *c* pendant l'apoptose pourrait être facilité par le remodelage des crêtes (modification du nombre et de la morphologie des crêtes) de la mitochondrie (Scorrano *et al.*, 2002).

Des études avec des modèles membranaires ont démontré que la formation de structures hexagonales induit la fusion membranaire et le rôle crucial des phospholipides dits « non-bilayer » comme la CL et la PE dans les mécanismes de fusion a été suggéré (Cullis et Kruijff, 1979). En effet, la réduction des niveaux de CL et PE résultent en une morphologie mitochondriale aberrante (Kawasaki *et al.*, 1999; Steenbergen *et al.*, 2005). La fusion membranaire est médiée par des protéines conservées lors de l'évolution, les dynamin-like GTPases présentes dans les deux membranes (Hoppins *et al.*, 2007). Dans la membrane interne, OPA1 (ou Mgm1 chez la levure) est processée de manière protéolytique, ce qui résulte en une accumulation d'isoformes courtes et longues, qui sont requises pour la fusion mitochondriale et la morphogénèse des crêtes (Herlan *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2007). Le processing de Mgm1 chez la levure est affecté en absence de Ups1 et Ups2, qui régulent l'accumulation de CL dans la mitochondrie (Sesaki *et al.*, 2006).

2.3. Les membranes : état physique

Les caractéristiques physico-chimiques des lipides, que sont la température de transition, la géométrie, la nature de leur tête polaire, la capacité à donner/accepter les liaisons hydrogène au niveau de l'interface lipide-eau, ou encore la conformation de leurs chaînes

acyles, peuvent induire une organisation latérale non aléatoire de la membrane. En effet, les lipides présentent des différences de miscibilité à l'origine de la formation de domaines membranaires. Un lipide, au sein d'une membrane, peut présenter une conformation spécifique selon sa nature et la température. Cette conformation particulière dépend de l'arrangement spatial des atomes de la molécule dans la bicouche et plus particulièrement des carbones des chaînes acyles.

On distingue plusieurs conformations, également appelées phases, qui dépendent de la température. La Figure 17 montre les différentes phases existantes pour le DPPC.

- à faibles températures, les lipides forment des structures cristallines denses. Dans la phase cristal, les chaînes carbonées peuvent être inclinées (phase L_c') ou non (phase L_c).

- L'augmentation de la température induit des mouvements de rotation des chaînes carbonées. Il y a transition de phase d'un cristal à deux dimensions en une phase gel (L_β ou L_β' selon l'inclinaison des lipides), moins compacte.

- Lorsque la température du système est augmentée, il y a de plus en plus de mouvements de rotation autour des liaisons carbone-carbone. Les conformations des chaînes acyles sont alors désordonnées ; on parle de phase fluide ou liquide désordonnée ou L_α . Contrairement aux phases cristal et gel, les chaînes carbonées des lipides en phase fluide sont désordonnées.

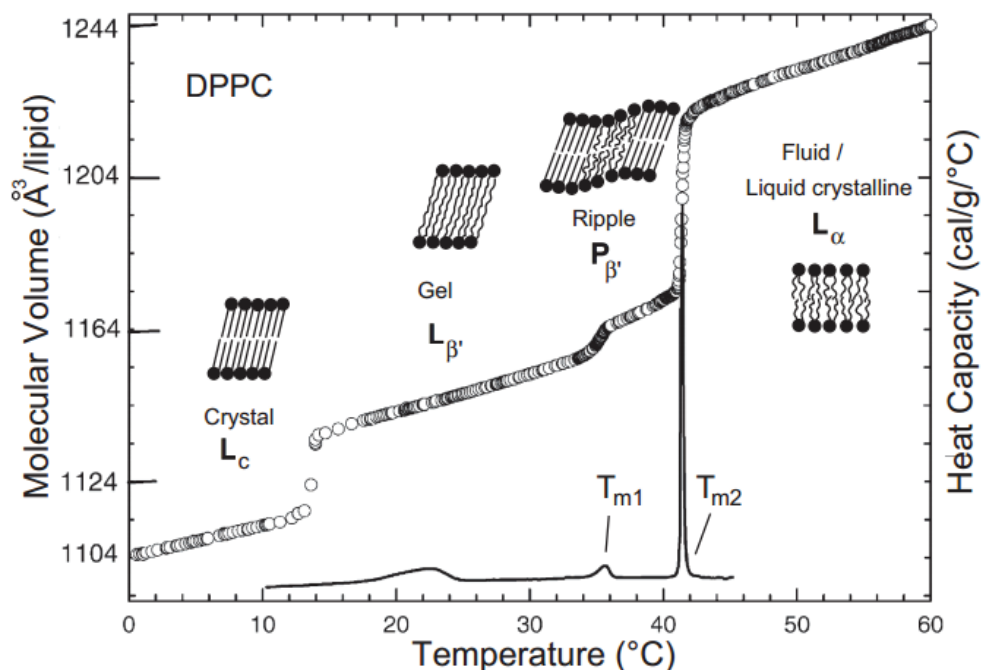


Figure 17 : Transitions de phase de la phosphatidylcholine. Surface par tête lipidique (cercles) et capacité calorifique (ligne continue) en fonction de la température pour des bicouches de DPPC dans l'eau en excès. Adapté de (Tristram-Nagle *et al.*, 1987).

Dans le cas des phosphatidylcholines, la dimension de la tête polaire est supérieure à celui de l'encombrement de deux chaînes hydrocarbonées en contact étroit et étirée au maximum. De ce fait, la conformation la plus stable des chaînes hydrocarbonées dans la phase gel cristalline est obtenue lorsque les chaînes sont inclinées par rapport au plan de la bicouche (conformation β'). Lors de la transition $L_{\beta'}$ en L_{α} , il y a alors passage par la phase intermédiaire $P_{\beta'}$ (Ripple Phase) dans laquelle les chaînes hydrocarbonées se redressent, ce qui entraîne une distorsion de la bicouche.

Lors de l'augmentation de la température, la transition principale correspond alors à la transition de phase $P_{\beta'}$ vers L_{α} .

La température marquant l'apparition d'une phase, c'est-à-dire pour laquelle une phase n'est plus homogène et où des molécules se trouvant dans une autre phase apparaissent (au début et à la fin de chacune des transitions de phase), est appelée température critique et notée T_c (il y a donc 2 T_c pour chaque transition de phase).

La température de transition entre les états gel et les états fluides est appelée température de transition de phase (T_m). La transition de phase est un phénomène mettant en jeu les propriétés collectives de l'ensemble des lipides de la membrane : une transition de phase nette correspond à un nombre important de lipide qui changent de conformation.

La longueur des chaînes acyles et le nombre de doubles liaisons que portent les lipides sont les deux caractéristiques principales ayant une influence sur T_m . En effet, plus il y a de liaisons carbone-carbone, plus il faut apporter d'énergie à la membrane pour initier les mouvements de rotation. Ainsi, plus les chaînes acyles sont longues, plus la T_m est élevée : par exemple, les membranes de DMPC (deux chaînes de 14 carbones) ont une T_m autour de 23°C alors que celles composées de DPPC (deux chaînes de 16 carbones) présentent une T_m plus élevée vers 41°C.

Les doubles liaisons en conformation trans augmentent la température de transition de phase alors que les doubles liaisons en conformation cis, plus présentes dans le monde du vivant, vont diminuer drastiquement cette température. Par exemple, le DOPC (C18:1;C18:1), qui a une double liaison en configuration cis sur chacune des chaînes acyles entre les carbones 9 et 10, a une température de transition autour de -20°C contre 55°C pour le DSPC en C18:0.

Dans le cas d'une membrane composée de différents lipides, la notion de phase telle qu'elle est définie est inappropriée et deux cas sont à l'origine de la ségrégation latérale de phase :

- si les lipides présentent différentes températures de transition de phase, il y aura des transitions différentielles, ce qui provoquera des hétérogénéités.

- deux lipides qui interagissent ensemble influent sur la transition de phase.

La longueur moyenne des chaînes acyles des phospholipides détermine l'épaisseur hydrophobe de la membrane. Quand une membrane passe de l'état gel à l'état fluide, le volume des phospholipides augmente. Par exemple chaque lipide d'une membrane de DPPC en phase gel (25°C) occupe un volume d'environ 0.94 ml/g, qui passe à 1.01 ml/g en phase fluide (50°C). Cette augmentation est la conséquence du plus grand espace occupé par les chaînes acyles dans le plan de la membrane. Inversement, la longueur apparente des chaînes désordonnées est plus courte, ce qui fait que l'épaisseur hydrophobe d'une bicouche en phase fluide est plus faible qu'en phase gel.

2.4. Les phases des lipides

A l'intérieur d'une cellule, l'organisation la plus stable des lipides est celle qui permet de minimiser les contacts entre les parties hydrophobes et les molécules d'eau. Aussi, les lipides s'organisent-ils le plus souvent en bicouches, partie apolaire au centre de la bicouche et partie polaire au contact du milieu aqueux. Il s'agit d'une organisation dite lamellaire. Cependant, la capacité des lipides à adopter, en solution aqueuse, une variété de structures autres que l'organisation lamellaire, telles que des tubes hexagonaux, des phases cubiques et des micelles, est bien connue.

La phase hexagonale inverse H_{II} consiste en une rangée de lipides organisés en cylindres remplis d'eau dont la surface est tapissée par les têtes polaires des lipides, les chaînes hydrocarbonées étant rejetées vers l'extérieur. Ces cylindres s'ordonnent suivant une symétrie hexagonale.

Il existe un autre type de phase hexagonale, présentant une symétrie de type H_I , dans laquelle les chaînes hydrocarbonées remplissent l'intérieur du cylindre, les têtes polaires sont orientées vers l'extérieur et l'eau occupe l'espace entre les cylindres.

Ces différentes phases résultent d'une optimisation des effets hydrophobes liés aux multiples interactions intra et intermoléculaires combinées avec les contraintes dues à la géométrie des lipides.

La propension des lipides à adopter telle ou telle organisation semble liée à un concept de forme :

- si le lipide s'inscrit dans un cylindre, l'organisation la plus favorable est lamellaire.
- si le lipide s'inscrit dans un cône, l'organisation est hexagonale.

- si le lipide s'inscrit dans un cône inversé, l'organisation est micellaire.

La nature des phases dépend également de leur concentration, de la température, du pH, et de la force ionique du milieu.

Les structures non lamellaires sont des structures en phase liquide-cristal; en phase gel, les lipides adoptent une organisation lamellaire.

Les lipides peuvent adopter une autre organisation, la phase cubique, qui consiste en une association en cylindres coordonnés de façon cubique. Cette forme est principalement présente dans les membranes des archaebactéries.

Chapitre 3 : Les interactions protéine/membranes

L'étude des mécanismes à l'origine de la genèse des domaines membranaires permet de mieux comprendre l'organisation des membranes et l'influence des propriétés physiques des domaines lipidiques sur leur différentes fonctions.

Une des approches possibles dans la compréhension de ces phénomènes est la mesure des variations des propriétés physiques de la membrane lipidique, ou d'une partie de la membrane, en fonction de sa composition en lipides (études sur des membranes lipidiques modèles) ou lors de la réalisation d'une fonction biologique particulière, telle la fixation d'une protéine à la membrane (études sur des complexes protéo-lipidiques modèles). Ainsi des modèles simplifiés, construits à partir de lipides de synthèse ou extraits des membranes cellulaires, ont été étudiés dans le but de comprendre les interactions qui régissent ces structures

3.1. Les modèles membranaires

3.1.1. Les liposomes

Les liposomes sont des structures fermées constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques organisées entre deux compartiments aqueux. Le libre passage des macromolécules d'un compartiment à l'autre est empêché au contraire de celui de quelques solutés hydrophobes qui peuvent diffuser au travers de la bicouche.

On distingue deux types de liposomes : les liposomes multilamellaires (MLV) de 0,4 à 5 μm de diamètre, constitués de plusieurs bicouches séparées par des compartiments aqueux et les liposomes unilamellaires, constitués d'une unique bicouche, parmi lesquels :

- les petites vésicules unilamellaires, ou SUV, de diamètre 0,02 à 0,1 μm
- les grandes vésicules unilamellaires, ou LUV, de diamètre 0,1 à 1 μm
- les vésicules géantes, ou GUV, de diamètre supérieur à 1 μm .

Globalement, la préparation de liposomes consiste à évaporer le solvant organique, généralement le chloroforme, dans lequel sont dissous les lipides, puis à les remettre en suspension dans un solvant aqueux (Bangham *et al.*, 1965). Cette opération doit se dérouler dans des conditions de température qui dépendent de la nature des lipides utilisés. En effet, les liposomes ne se forment qu'à une température supérieure à leur température de transition de phase. Dans un milieu aqueux, le film lipidique, s'hydrate et les lipides s'associent et forment une ou plusieurs bicouches, qui se referment autour d'un volume de solvant. On passe alors d'un état énergétiquement non favorable, avec les parties hydrophobes des lipides exposées au solvant, à un état énergétiquement favorable grâce à une minimisation du contact entre ces parties hydrophobes et le solvant aqueux (Figure 18).

Figure disponible à l'adresse suivante :

http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&id=1384&Itemid=372

Figure 18 : a. Explication énergétique de la formation de vésicule lipidique dans un milieu aqueux . b. Schéma récapitulatif de la formation des différents types de liposomes. (Tiré de http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&id=1384&Itemid=372).

Lors de cette préparation, des liposomes multilamellaires de taille très hétérogène sont formés et doivent être traités physiquement pour les transformer en vésicules unilamellaires de taille homogène (Figure 18). Les SUV s'obtiennent le plus fréquemment en soumettant une suspension de MLV aux ultrasons, mais il faut prendre des précautions pour empêcher ou limiter l'oxydation : utiliser des basses fréquences de sonication, durant un temps court et sous atmosphère d'azote ou d'argon. La solution de MLV est soumise à des cycles de congélation/décongélation, fragilisant les membranes et permettant de reconstruire des liposomes unilamellaires. Les MLV ou les LUV de trop grande taille sont ensuite éliminés par filtration grâce à un extruder.

Les liposomes présentent l'avantage d'offrir un système cellulaire simplifié avec une membrane sphérique enveloppant un compartiment interne. Cependant, le rayon de courbure des LUVs est bien plus important que celui d'une cellule.

3.1.2. Les GUVs

Les GUVs présentent l'avantage par rapport aux LUVs d'être suffisamment gros pour pouvoir être visualisés en microscopie.

Globalement, il existe deux méthodes générales pour préparer les liposomes géants, chacune présentant des avantages et des inconvénients :

- la méthode de l'hydratation douce : il existe plusieurs protocoles de fabrication de GUVs par cette méthode selon la qualité des vésicules désirée (unilamellaires stricts ou non, état physique des lipides,...). Mais brièvement la préparation consiste à mélanger les lipides dans un mélange chloroforme-méthanol. Ce mélange est ensuite soit évaporé puis réhydraté dans un tampon dans des conditions particulières (toute une nuit à 37°C sous atmosphère d'azote), soit directement mélangé avec le tampon d'intérêt et le solvant évaporé doucement. L'inconvénient de cette méthode d'hydratation est l'hétérogénéité des vésicules formées.

- l'électroformation : elle est divisée en deux étapes. La première étape est le dépôt des lipides sur l'électrode et la seconde étape est l'électroformation des vésicules sous l'impulsion d'un champ électrique. Cette méthode est assez rapide et présente l'avantage d'obtenir des GUVs relativement homogènes. Cependant, les produits de dégradation des lipides sont importants.

3.1.3. Les monocouches

Lorsqu'elles sont déposées à l'interface air/eau, les molécules amphiphiles se répartissent sur toute la surface disponible. Les chaînes aliphatiques restent dans l'air alors que la partie polaire des molécules s'immerge dans la phase aqueuse, formant à l'interface air-tampon une monocouche plus ou moins condensée que l'on appelle monocouche de Langmuir.

Les monocouches présentent plusieurs avantages en tant que modèle membranaire de par leur stabilité et leur géométrie planaire où les lipides ont une orientation spécifique. La densité de lipides présents dans la monocouche ainsi que la pression générée par les lipides peuvent être contrôlées. Cependant, elles ne permettent de mimer qu'un demi-feuillet membranaire plan.

3.2. Les techniques de caractérisation des interactions protéine-modèle membranaire

3.2.1. La fluorescence

L'une des techniques les plus intéressantes pour caractériser l'interaction des protéines avec les liposomes est la spectroscopie de fluorescence. Des informations concernant la structure tertiaire des protéines et leur environnement peuvent être obtenues en utilisant la fluorescence intrinsèque, due aux résidus tryptophanes. D'autre part, des sondes de fluorescence peuvent également être ajoutées lors de la préparation des liposomes afin de caractériser l'interaction au niveau des membranes lipidiques.

3.2.1.1. Principe général

L'excitation d'une molécule par une lumière s'accompagne de l'absorption d'un photon de longueur d'onde définie. La molécule passe alors d'un état fondamental (état de plus faible énergie) à un état excité (de plus forte énergie). Une fois l'énergie absorbée (10^{-15} s), la molécule perd cette énergie sous forme de chaleur, par cascades au travers des différents niveaux vibrationnels de tous les états singulets excités (conversion interne) jusqu'au niveau vibrationnel le plus bas du premier état excité (10^{-12} s). La molécule appelée fluorophore peut alors revenir à son état fondamental en émettant un photon. Dans le cas des tryptophanes, le retour à l'état fondamental s'effectue en 10^{-9} s.

Pour un fluorophore polaire, le moment dipolaire change sous l'effet de l'excitation. Les dipôles de solvant ont besoin de se réorienter autour de ce nouveau dipôle excité qu'est le fluorophore, pour atteindre une orientation énergétiquement favorable. Ce réajustement des interactions dipolaires des molécules de solvant avec le fluorophore se déroule en deux étapes :

- redistribution des électrons dans les molécules de solvant environnantes (polarisation électronique de l'environnement) à cause du moment dipolaire altéré du fluorophore excité
- suivi par une réorientation physique des molécules de solvant autour du fluorophore excité.

La première étape est pratiquement instantanée, en effet, la redistribution des électrons dans les molécules de solvant survient presque à la même échelle de temps que le processus d'excitation du fluorophore (10^{-15} s). D'un autre côté, la réorientation des dipôles de solvant requiert un net déplacement physique et est un processus plus lent. Il est dépendant de la restriction de la mobilité des molécules par la matrice environnante. Plus précisément, pour un fluorophore polaire dans un solvant non visqueux, cette réorientation apparaît à une échelle de

temps de l'ordre de 10^{-12} s, de telle façon que les molécules de solvant se réorientent complètement autour du dipôle excité pendant son temps de vie à l'état excité, qui est généralement de 10^{-9} s. Dans ce cas-là, toute l'émission est seulement observée depuis l'état excité le plus bas, quelle que soit la longueur d'onde d'excitation, la position du maximum d'émission est donc indépendante de la longueur d'onde d'excitation, c'est la règle de Kasha. Cette règle stipule que la fluorescence survient entre le niveau le plus bas de l'état excité et le premier état fondamental de la molécule.

Par contre, si le fluorophore est placé dans un environnement visqueux, le processus de réorientation est ralenti jusqu'à 10^{-9} s ou plus. Dans ces conditions, la longueur d'onde d'excitation est graduellement déplacée vers la zone rouge du spectre d'absorption et excite sélectivement la sous population de fluorophores qui interagissent le plus avec les molécules de solvant excitées. Ce sont les fluorophores autour desquels les molécules de solvant sont orientées d'une manière similaire à l'orientation adoptée dans l'état excité de plus basse énergie.

3.2.1.2.Red Edge excitation Shift (REES)

L'origine moléculaire du REES réside dans l'altération des interactions fluorophore-solvant dans les états excités et fondamentaux, causée par un changement du moment dipolaire du fluorophore excité et de la quantité de molécules de solvant qui se réorientent autour de ce fluorophore.

Les conditions nécessaires pour avoir du REES sont qu'une population différente est excitée à chaque longueur d'onde d'excitation et, plus important, que la différence est maintenue dans le laps de temps du temps de vie de la fluorescence. Ceci nécessite un temps de relaxation dipolaire pour le solvant environnant comparable ou plus long que le temps de vie de fluorescence, de telle façon que la fluorescence survient de plusieurs états partiellement relaxés.

Les critères essentiels pour observer le red edge effect sont :

- le fluorophore doit être polaire pour être capable de réorienter correctement les molécules de solvant voisines dans l'état fondamental.
- les molécules de « solvant » (eau, squelette protéique, tête polaire des lipides) autour du fluorophore doivent être polaires
- le temps de réorientation autour du dipôle excité doit être comparable ou plus long que le temps de vie de la fluorescence

- il doit y avoir un changement relativement important dans le moment dipolaire du fluorophore qui subit l'excitation.

En général, le moment dipolaire des molécules augmente sous l'effet de l'excitation.

Modèle des deux états (Haldar *et al.*, 2011):

Ce modèle stipule que l'émission de fluorescence a lieu depuis deux états discontinus ou discrets (Figure 19) : l'état initial appelé Franck-Condon (FC) et l'état excité de plus basse énergie (R). L'excitation au maximum de la bande d'absorption (λ_c) fait passer la molécule depuis l'état fondamental jusqu'à l'état FC où la réorientation du solvant n'a pas encore eu lieu.

Le niveau de relaxation du solvant est déterminé par les interactions générales et spécifiques entre le fluorophore et les molécules de solvant environnantes et le taux auquel ces interactions sont modifiées en réponse à la création d'un nouveau dipôle excité. Si λ_c correspond à la longueur d'onde d'excitation pour obtenir une excitation directe de l'état FC et λ_r correspond à l'excitation pour obtenir l'état R ($\lambda_r > \lambda_c$) alors il peut y avoir trois possibilités (comme montré sur la Figure 19) :

- Si le temps de réorientation du solvant (τ_s) est plus rapide que le temps de vie de fluorescence (τ_f), c'est-à-dire $\tau_s \ll \tau_f$, les molécules de solvant ont suffisamment de temps de se réorienter avant l'émission de fluorescence. L'excitation de l'état FC ou de l'état R produit dans les deux cas un spectre d'émission centré sur λ_2 . C'est le cas lorsque le fluorophore est dans un milieu non visqueux ou à hautes températures.

- Si le fluorophore est placé dans des conditions de contraintes spatiotemporelles, le temps de relaxation est augmenté et est plus long que τ_f . Dans ces conditions, l'émission depuis l'état FC présente un maximum à λ_c . Cependant, sous l'effet d'une excitation énergétiquement plus basse (λ_r), une sous population de fluorophore serait sélectionnée, autour de laquelle les dipoles sont orientés de manière à décroître la différence d'énergie entre les états excités et fondamentaux. Le red edge excitation dans ces conditions sélectionne par conséquent une sous population de molécules qui présentent un environnement « solvant relaxé » et un spectre d'absorption et d'émission décalés vers le rouge.

- Lorsque $\tau_F \approx \tau_S$, c'est à dire dans des conditions de viscosité ou de température intermédiaires, l'excitation à λ_C donne lieu à un spectre centré à une longueur d'onde entre λ_1 and λ_2 . En effet, même si seul l'état FC est excité, les valeurs de τ_F and τ_S permettent une émission depuis les états FC et R. L'excitation à λ_r donne une emission depuis l'état R et donc un spectre centré sur λ_2 .

Figure 1 de l'article (Haldar *et al.*, 2011)

Figure 19 : Modèle des deux états tiré de (Haldar *et al.*, 2011)

Dans ce travail, le REES est utilisé pour déterminer l'environnement des tryptophanes et/ou mettre en évidence un changement structural au sein des protéines suite à leur interaction avec les membranes.

Pour étudier l'effet des protéines sur l'état physique des membranes, il est nécessaire d'utiliser une sonde membranaire de fluorescence puisque les phospholipides utilisés ne présentent pas de propriétés de fluorescence.

Il existe toute une gamme de sondes sensibles à différentes propriétés des membranes lipidiques. La sélectivité de ces sondes vis-à-vis d'une propriété particulière est réalisée par un choix approprié du fluorophore ainsi que par sa localisation précise au sein de la bicouche lipidique. Il existe par exemple, des sondes sensibles à l'hydratation et à la charge de surface (F2N12S) (Hope-Roberts *et al.*, 2011), au potentiel dipolaire (F8N1S et PPZ8) (Shynkar *et al.*, 2005)(Klymchenko *et al.*, 2003) et au potentiel transmembranaire (di-SFA) (Klymchenko *et al.*, 2006). Pour notre étude, nous avons choisi une sonde membranaire sensible à la polarité de l'environnement : le Laurdan.

3.2.1.3. Le Laurdan

Le Laurdan est une sonde fluorescente amphiphile porteuse d'un acide gras (6-dodecanoyl-2-diméthylaminonaphtalène), et qui a été conçue et synthétisée par G. Weber et Farris (1979).

Figure 5 de l'article (Bagatolli, 2006)

Figure 20: Structure et localisation du Laurdan dans la couche externe de la bicouche phospholipidique (Bagatolli, 2006)

Dans une bicouche phospholipidique, le Laurdan est fortement ancré dans la partie hydrophobe par les interactions de Van der Waals existant entre sa chaîne d'acide laurique et les chaînes lipidiques (Figure 20). Son noyau fluorescent est localisé au niveau de l'interface hydrophile-hydrophobe (Chonget Wong, 1993). Le Laurdan étant pratiquement insoluble dans

l'eau, sa fluorescence est entièrement issue d'un environnement phospholipidique (Parasassi *et al.*, 1993).

Le maximum d'émission de cette sonde dans les bicouches phospholipidiques dépend de la polarité locale et de l'état physique dans lequel se trouve la membrane. Ainsi, le spectre d'émission du Laurdan montre un important déplacement bathochrome lors de la transition de phase de l'état gel à l'état cristal liquide. Les deux bandes d'émission ainsi caractérisées, bleue (~ 440 nm) et rouge (~ 490 nm) sont attribuées respectivement à l'émission de ces sondes en phase gel et en phase cristal liquide (Figure 21).

Figure 1 de l'article (Parasassi *et al.*, 1991)

Figure 21 : Spectres d'excitation et d'émission normalisés du Laurdan dans des vésicules multilamellaires de DPPC à 20°C (—) et à 60°C (----) (Parasassi *et al.*, 1991)

Les caractéristiques du Laurdan observées sur le spectre d'émission se retrouvent également à l'excitation (cf Figure 21). En effet, en phase gel, le maximum d'excitation est de 390 nm, tandis qu'en phase cristal-liquide il est d'environ 340 nm.

Afin de quantifier les propriétés dynamiques de la membrane par des mesures de fluorescence, Parasassi et ses collaborateurs (1991) ont développé le concept de polarisation généralisée. Le paramètre est calculé à l'aide la relation suivante :

$$GP = \frac{I_g - I_l}{I_g + I_l} GP = \frac{I_g - I_l}{I_g + I_l}$$

I_g et I_l étant les intensités de fluorescence caractéristiques des phases gel et cristal liquide. On peut ainsi calculer un GP d'excitation (GP_{exc}) et un GP d'émission (GP_{em}), qui sont obtenus lorsqu'on utilise respectivement une longueur d'excitation ou d'émission fixe.

Les spectres GP_{exc} et GP_{em} peuvent être tracés en fonction des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectives comme montré dans la Figure 22A (Parasassi *et al.*, 1991). Pour les spectres de GP_{exc}, une pente négative traduit un état liquide cristallin, une pente positive traduit une coexistence de phase et inversement pour les spectres GP_{em}. Dans les deux cas, une pente nulle peut correspondre à un état gel, ou comme il a été trouvé récemment (Velazquez et Fernandez, 2006), à la limite d'apparition de la coexistence de phase. Cette limite est appelée T_o .

Figure 1 et 2 de l'article Velazquez et Fernandez, 2006)

Figure 22: (A) Spectre de polarisation généralisée du Laurdan dans des vésicules de DPPC à des températures différentes. (a) 16°C ; (b) 28°C ; (c) 32°C ; (d) 33°C ; (e) 34°C ; (f) 41°C ; (g) 50°C. Les lignes sont les régressions linéaires des courbes. (B) GPexcS et GPemS en fonction de la température. La flèche rend compte de To et la ligne pointillée de Tc (Velazquez et Fernandez, 2006).

Si chaque spectre GPexc et GPem est tracé pour des températures différentes alors il est possible d'estimer la température de transition de phase du modèle lipidique étudié. Cependant jusque récemment, l'analyse des spectres GP se limitait à décrire la tendance des courbes (pente positive, pente négative...). Les travaux de Velazquez *et al.* apportent des précisions sur l'interprétation des résultats de fluorescence du Laurdan dans le but d'étudier Tm : ils montrent la possibilité d'approximer les courbes de GP à des droites et par conséquent d'analyser les résultats en terme de pente appelées GPexcS et GPémS, en fonction de la température (Figure 22B).

$$GP_{excS} = \frac{GP_{exc}^{410} - GP_{exc}^{340}}{410 - 340}$$

$$GP_{émS} = \frac{GP_{ém}^{490} - GP_{ém}^{440}}{490 - 440}$$

A des faibles températures, les valeurs de GPexcS sont proches de zéro et correspondent à la phase gel. Lorsque la température est augmentée, la valeur de GPexcS augmente, comme attendu pour une coexistence de phase, puis décroît subitement en croisant l'axe des abscisses et atteint des valeurs négatives typiques d'une phase liquide-cristallin. Concernant les GPémS, à faibles température correspondant à une phase gel, ils sont proches de zéro, puis diminuent pour une coexistence de phase, puis augmentent en croisant l'axe des abscisses et deviennent positifs, typique d'une phase liquide-cristallin. De façon intéressante, les intersections des GPexcS et GPémS avec l'axe des abscisses coïncident avec la température limite entre la coexistence de phase et la phase liquide cristallin.

3.2.2. Fourier Transformed-InfraRed spectroscopy (FTIR)

Les fréquences infrarouges (IR) correspondent, pour une molécule, à des changements d'énergie de vibration et de rotation. Lorsqu'une molécule reçoit un rayonnement IR, il y a absorption pour chacune des fréquences correspondant à une vibration possible. L'amplitude des vibrations est augmentée, et le retour à l'état fondamental libère cette énergie sous forme de chaleur.

De fortes absorptions dans l'infrarouge sont observées pour les groupements présentant un dipôle permanent. Dans la région du moyen infrarouge ($4000 - 1000 \text{ cm}^{-1}$), deux types de vibrations principales sont observées : des vibrations le long des liaisons chimiques, appelées vibrations d'élongation impliquant des changements dans la longueur de la liaison ; et des vibrations mettant en jeu les angles des liaisons, les vibrations de déformation.

Les vibrations d'élongation peuvent être modélisées comme un oscillateur harmonique, dans lequel une liaison chimique est représentée par deux masses ponctuelles reliées par un ressort. Ces vibrations peuvent être asymétriques ou symétriques, selon que les éléments de symétrie de la molécule sont conservés ou non par la vibration. La fréquence de vibration dépend de la masse des atomes impliqués dans la liaison, mais également de la force de la liaison, avec des fréquences plus hautes pour les doubles et triples liaisons par rapport aux liaisons simples.

L'implication d'un des atomes dans une liaison hydrogène affaiblit la force de la liaison, et induit un décalage vers les basses fréquences du mode d'élongation du groupement chimique. La sensibilité de cette méthode est haute, et rend compte de changements dans la longueur de liaison, plus petits que $0,2 \text{ \AA}$ (Barth, 2007). Pour un groupement carbonyle, la formation d'une liaison hydrogène peut induire un décalage vers les basses fréquences jusqu'à 20 cm^{-1} . L'étude des fréquences d'élongation des groupements chimiques révèlent des informations sur des détails de structure. La formation ou la perturbation d'une liaison hydrogène en est un.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet donc d'obtenir des données précises sur la structure secondaire des protéines ainsi que sur les différents groupements chimiques des phospholipides et donc de tirer des informations sur les modifications de l'état physique de la membrane suite à la fixation de la protéine ainsi que sur le changement de structure de la protéine.

Le spectre d'absorption infrarouge des protéines est essentiellement représenté par l'absorption des liaisons peptidiques. Les fréquences d'élongation du groupement C=O du squelette peptidique apparaissent entre $1680\text{-}1620 \text{ cm}^{-1}$ et forment la bande Amide I, alors que les fréquences d'élongation des groupements CN ainsi que les fréquences de déformation dans le plan apparaissent à $1560\text{-}1520 \text{ cm}^{-1}$ et constituent la bande Amide II (Barth, 2007; Berthomieu et Hienerwadel, 2009). Ces positions sont modifiées selon le milieu, eau ou eau lourde, dans lequel sont analysés les échantillons. La caractérisation de la structure des

protéines se fait préférentiellement dans l'eau lourde, qui contrairement à l'eau n'absorbe pas dans la région de la bande amide I.

Figure 1 de l'article (Berthomieu et Hienerwadel, 2009).

Figure 23 : Modèle de l'oscillateur harmonique. Tiré de (Berthomieu et Hienerwadel, 2009).

La bande amide I d'une protéine dépend des structures secondaires de la protéine, avec des modes de fréquences distincts pour les hélices α , les boucles ou feuillets β répertoriées dans le Tableau 6.

Structure secondaire	Position de la bande en cm^{-1}
hélice α	1642-1660
feuillelet β intramoléculaire	1630-1675
feuillelet β intermoléculaire	1610-1680
structure aperiodique	1640 à 1648

Tableau 6 : Position des bandes caractéristiques des principales structures secondaires dans l'eau lourde.

De même, les spectres IR des lipides ont été étudiés et la plupart des bandes ont été caractérisées en détail. Les bandes observées dans la région $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, qui proviennent de façon prédominante des vibrations d'élongation symétriques et asymétriques des groupements CH_2 ($2920\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$) et CH_3 ($2960\text{-}2870\text{ cm}^{-1}$) (Arrondo *et al.*, 1984), sont connues pour être sensibles aux changements induits par la température, et par conséquent à l'état physique des membranes ainsi qu'à la liberté de mouvement des groupements méthyle.

Les spectres IR des lipides sont également caractérisés par la position de la bande correspondant à la vibration d'élongation C=O des esters, située à environ 1730 cm^{-1} , et qui peut apporter des informations sur les liaisons hydrogène impliquant les groupements carbonyles des lipides. Cette bande est la résultante de deux composantes majeures : une à 1742 cm^{-1} rendant compte des esters non hydratés et une à 1728 cm^{-1} traduisant la présence des esters hydratés (Lewis *et al.*, 1994).

Parmi les vibrations caractéristiques des phosphates, les plus utilisées sont celles dues à l'élongation de la double liaison P=O , symétrique à 1085 cm^{-1} ou antisymétrique à 1228 cm^{-1} (Arrondo *et al.*, 1984). Les élongations de la simple liaison P-O sont situées dans la région $800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ mais sont difficilement observables à cause de l'absorption de l'eau.

3.2.3. Les monocouches de Langmuir

Les propriétés des monocouches sont étudiées par mesure de la pression de surface. Ces mesures reposent sur la propriété des molécules polaires de s'arranger dans un liquide (Figure 24).

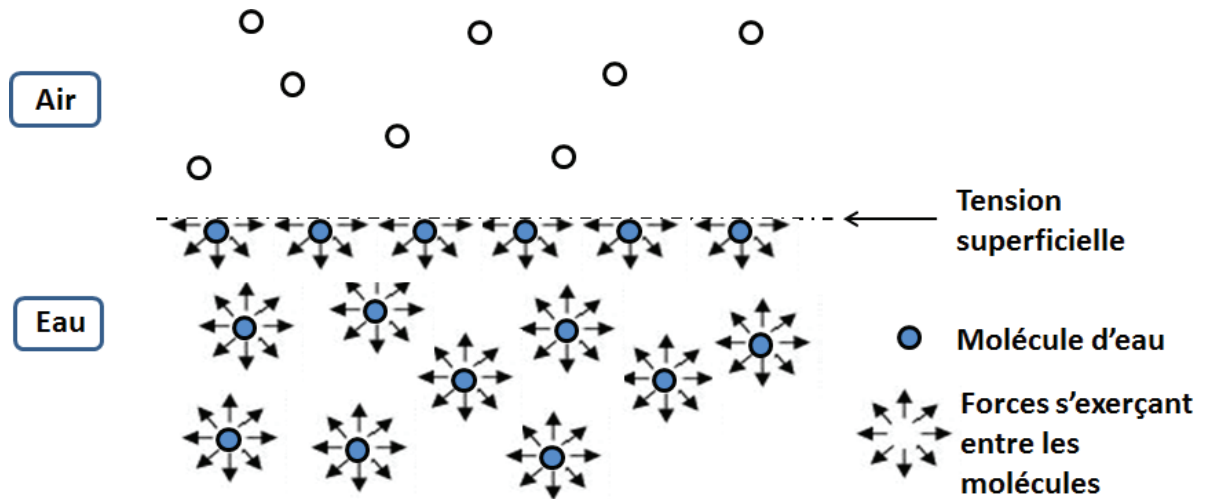


Figure 24 : Schéma représentant les forces existantes entre les molécules dans un liquide.

A l'intérieur du liquide, les forces de cohésion entre les molécules sont réparties entre les molécules voisines de telle façon que la résultante des forces soit nulle. Cette situation est énergétiquement la plus favorable.

A la surface, cette résultante n'est plus nulle mais dirigée vers l'intérieur du liquide (Figure 24). Les molécules de l'interface sont par conséquent attirées vers le cœur du liquide, d'où sa tendance à exposer le minimum de molécules à l'interface et donc à minimiser l'aire de contact avec l'air.

La grandeur qui caractérise la résistance à l'augmentation de l'aire de l'interface est appelée tension superficielle et notée γ . Elle est définie par le rapport de l'énergie (δE) qui doit être fournie à un système pour augmenter son aire d'une quantité δA :

$$\gamma = \delta E / \delta A$$

L'unité de mesure de la tension superficielle est définie comme une unité de force par une unité de surface s'exprimant en J/m^2 ou en N/m . La tension superficielle dépend du liquide et de la température. Celle de l'eau pure est de 72,8 mN/m à 20°C.

Dans le cas d'une monocouche, les molécules amphiphiles abaissent la tension superficielle de l'eau pure puisqu'elles constituent un intermédiaire entre l'eau et l'air. La

pression de surface (appelée π) peut alors être définie comme la différence entre γ_0 tension superficielle de l'eau pure, et γ , celle d'une monocouche déposée à l'interface air-eau.

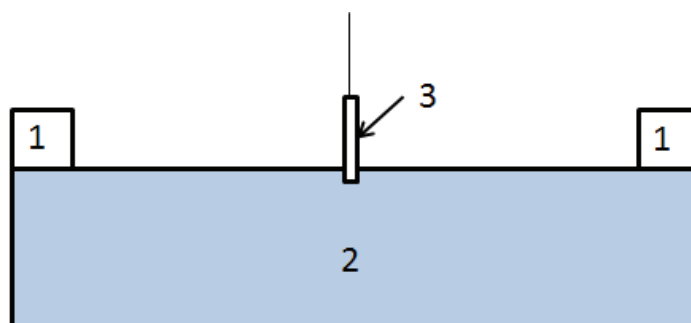


Figure 25 : Balance de Wilhemy. 1 : barrières. 2 : sous-phase. 3 : lame de Wilhelmy.

La mesure de la pression de surface est réalisée par une lame de Wilhelmy. L'une des extrémités de la lame est en contact avec l'interface, l'autre est reliée à un capteur de déplacement (Figure 25). Deux barrières permettent de comprimer et décompresser le film à l'interface.

Les monocouches de Langmuir constituent un modèle d'assemblage moléculaire performant pour l'analyse des propriétés des lipides et des protéines associées aux membranes et peuvent être utilisées pour la mise en évidence d'interactions spécifiques entre les divers composants des membranes cellulaires.

3.2.4. La pression d'insertion maximale (PIM)

Une des méthodes pour comparer les niveaux d'interaction d'une protéine avec différents lipides est de mesurer jusqu'à quelle pression latérale de surface une protéine est capable de s'insérer.

Les lipides solubilisés dans un solvant organique sont étalés à l'interface air/eau jusqu'à ce que la pression de surface initiale désirée soit atteinte (π_i). Une quantité optimale de protéine est alors injectée dans la sous-phase sous la monocouche. En cas d'interaction avec les lipides et d'insertion dans une monocouche, l'injection du peptide ou de la protéine induit une augmentation de la pression de surface jusqu'à une valeur stable appelée pression d'adsorption à l'équilibre (π_e). L'augmentation de la pression de surface peut alors être calculée par l'équation $\Delta\pi = \pi_e - \pi_i$.

Le degré d'augmentation de la pression de surface dépend de la pression de surface initiale et peut être utilisé pour comparer le niveau d'interaction entre les protéines et les lipides. Afin de déterminer la PIM, la protéine doit être injectée sous des monocouches à

différentes π_i . Ensuite, une régression linéaire est obtenue en traçant le graphique de $\Delta\pi=f(\pi_i)$. La PIM correspond à la valeur de la pression de surface (en mN/m) où cette régression croise l'axe des abscisses (Calvez *et al.*, 2011).

3.2.5. Microscopie à angle de Brewster (BAM)

Cette technique, développée en 1991 en parallèle par Hénon et Meunier, et Hönig et Möebius, permet la visualisation directe, à l'échelle du micron, des films de molécules amphiphiles à l'interface air-eau (Henon et Meunier, 1991; Hönig et Möbius, 1991). Le principe de la microscopie à l'angle de Brewster est basé sur les propriétés de réflectivité d'une interface.

Lorsqu'une interface parfaitement plane et infiniment mince (interface de Fresnel) séparant deux milieux transparents d'indices de réfraction n_1 et n_2 est éclairée par un faisceau de lumière polarisée parallèlement au plan d'incidence (onde polarisée P) on enregistre deux phénomènes :

- une réfraction du rayon incident, avec une déviation qui dépend de l'indice de réfraction du deuxième milieu ;
- une réflexion du rayon incident à un angle égal à l'angle d'incidence

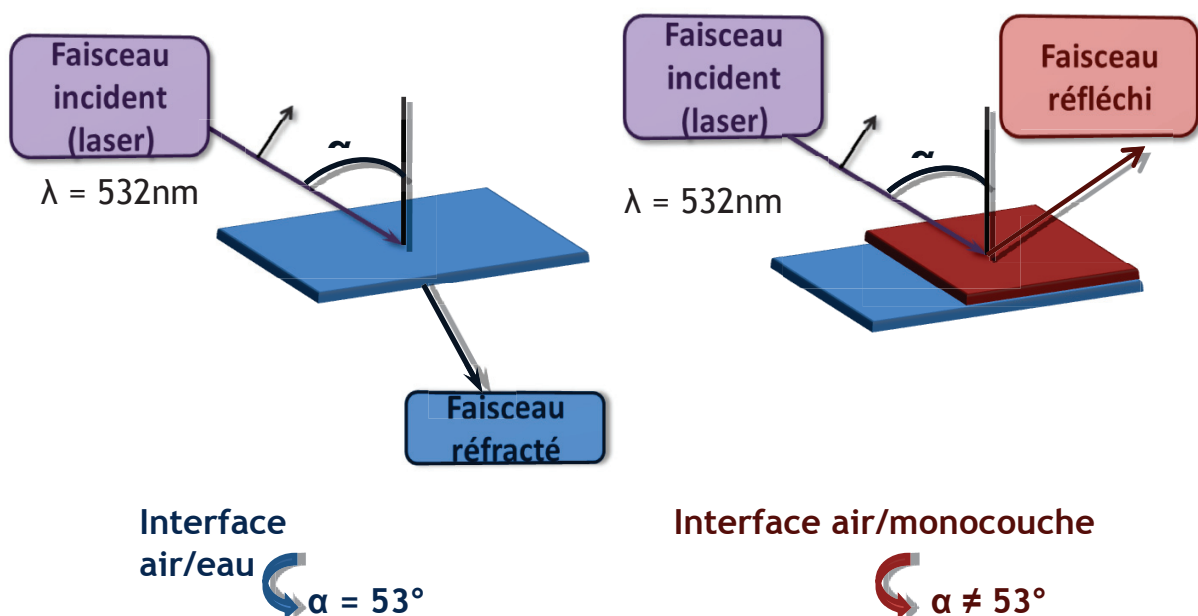


Figure 26 : Principe de la microscopie à angle de Brewster.

À un angle particulier, dépendant de chaque type d'interface, la réflexion est annulée. L'angle de Brewster est défini par la relation :

$$\tan \alpha = n_1 / n_2$$

Pour l'interface air-eau cet angle vaut 53°.

La microscopie à l'angle de Brewster repose sur ces principes. Ainsi, à l'interface air-eau, pour une incidence à l'angle de Brewster, le faisceau est entièrement réfracté. En présence d'un film mince, les caractéristiques de l'interface changent, le faisceau est partiellement réfléchi et l'intensité de la lumière réfléchie est dépendante de l'épaisseur et de l'indice de réfraction du film. On est ainsi capable de visualiser les hétérogénéités optiques du film, par exemple les coexistences de phase, avec une résolution de l'ordre de la longueur d'onde. Comme la lumière utilisée est polarisée, on est également sensible aux éventuelles anisotropies optiques.

En plaçant une caméra CCD dans la direction du rayon réfléchi, la visualisation d'une monocouche devient possible à l'échelle du micron, ceci sans rajouter de sondes fluorescentes qui pourraient perturber l'organisation du système. Ainsi les régions plus épaisses ou plus condensées dans une monocouche vont apparaître plus brillantes sur l'image. L'exemple de la visualisation des transitions de phase liquide expansé – liquide condensé montre les domaines condensés, plus organisés, donc plus épais et à indice de réfraction plus élevé qui apparaissent donc comme des zones plus claires sur un fond foncé. Les domaines condensés peuvent être aussi bien circulaires qu'en spirale ou dendritiques (Figure 27).

Figure 2 de l'article (Groger *et al.*, 2010).

Figure 27 : Image de microscopie à angle de Brewster d'un monofilme de DMPE à 7,6 mN/m (A) et à 10,2 mN/m (B). Image de microscopie à angle de Brewster d'un monofilme de DMPG à 20,2 mN/m (C) et à 16 mN/m (D). Image de microscopie à angle de Brewster d'un monofilme de DMPE-DMPG (7 : 3) à 12,9 mN/m (E) et à 17,6 mN/m (F). Tiré de (Groger *et al.*, 2010)

3.2.6. Interférométrie à double polarisation

Le DPI (Dual Polarisation Interferometry) est une technique analytique, permettant de mesurer l'épaisseur et la densité de films moléculaires avec une grande précision et en temps réel. Cette technique est basée sur l'étude du changement de vitesse de la lumière, se propageant dans un guide d'onde, résultant d'un changement d'indice de réfraction à sa surface.

Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une interface entre deux milieux d'indice de réfraction différent, une partie de la lumière incidente est réfléchi sur l'interface et l'autre partie de la lumière est réfractée à travers la surface. En condition de réflexion totale, c'est-à-dire quand l'angle d'incidence du faisceau lumineux θ est supérieur à une valeur critique θ_m , il n'y a plus de rayon réfracté transmis et seul subsiste un rayon réfléchi (Figure 28) et une des composantes électromagnétiques de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde et son amplitude diminue de manière exponentielle. Le profil de l'onde évanescente dépend des propriétés de la lumière dans le guide d'onde mais aussi de la structure du guide d'onde en termes de dimension et d'indice de réfraction. Tout changement d'indice de réfraction à la surface du guide d'onde va modifier la propagation de la lumière.

Il est à noter que ce phénomène n'intervient que lorsque le rayon lumineux incident se trouve dans un milieu d'indice de réfraction plus grand que l'éventuel rayon réfracté : réfraction de type verre/air par exemple.

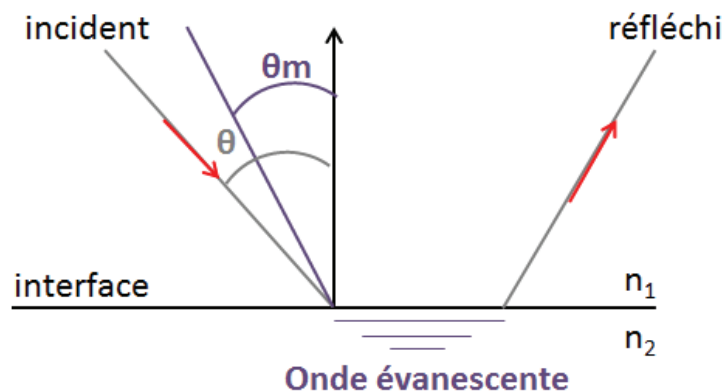


Figure 28 : Principe de l'onde évanescente.

Le DPI est basé sur l'envoi d'un faisceau de lumière polarisée au niveau de deux guides d'ondes : l'un correspond à un guide d'onde senseur, et présente une surface exposée tandis que l'autre sert de référence (Figure 29). Afin de résoudre les propriétés du film moléculaire, par l'utilisation des équations de Maxwell, deux polarisations orthogonales sont propagées à travers les guides d'ondes, le transverse électrique (TE) et le transverse magnétique (TM). Chaque mode, TM et TE, génèrent un champ évanescent différent au niveau de la surface du guide d'onde senseur interagissant avec les molécules venant à son contact, ce qui modifie alors l'indice de réfraction. Quand cela arrive, la différence de phase

entre le guide d'onde senseur et le guide d'onde de référence est altérée et la position des franges d'interférences change. Le motif de franges d'interférence pour chaque composante TE et TM, illumine une caméra CCD et les signaux obtenus qui sont corrélés avec un changement de vitesse de la lumière sont traités et des données en terme d'épaisseur et d'indice de réfraction sont récupérées.

Le DPI permet d'étudier deux paramètres les caractéristiques d'un film moléculaire : la masse déposée sur le capteur et la biréfringence, paramètre rendant compte de l'état d'organisation de la bicouche lipidique. On peut ainsi analyser de manière précise des changements de structures, une stœchiométrie d'interaction ou une discrimination d'une fixation non spécifique d'une fixation spécifique...

Figure 1 de l'article (Biehle *et al.*, 2004)

Figure 29 : Principe du Dual Polarization Interferometry. (Biehle *et al.*, 2004)

Dans le cas de l'étude des interactions protéines-lipides, une bicouche lipidique supportée est formée sur le senseur. La protéine est ensuite injectée par un système microfluidique et l'interaction est étudiée sous flux de tampon. Les données obtenues permettent de mesurer, en plus des données citées précédemment, la pénétration d'une protéine dans la bicouche lipidique, et l'organisation globale de la bicouche (anisotropie, couche plus ou moins ordonnée).

Masse par unité de surface d'une membrane adsorbée :

La masse par unité de mesure pour une membrane anisotropique adsorbée est calculée en utilisant la formule ci-dessous (Lee *et al.*, 2010b):

$$m_{lipid} = d_f n_{iso} - n_{buffer} / (dn/dc)_{lipid}$$

$$m_{peptide} = d_f (n_{iso} - n_{buffer}) / (dn/dc)_{peptide}$$

m_{lipid} : masse de lipides dans la bicouche

$m_{peptide}$: masse de peptides liés à la bicouche

d_f : épaisseur de la bicouche

n_{iso} : indice de réfraction moyen calculé à partir des indices de réfraction mesurés expérimentalement n_{TM} et n_{TE} grâce à la formule (Lee *et al.*, 2010b):

$$n_{iso} = \sqrt{(n_{TM}^2 + 2n_{TE}^2)/3}$$

n_{buffer} : indice de réfraction du tampon

$(dn/dc)_{lipid}$: incréments de l'indice de réfraction des lipides

$(dn/dc)_{peptide}$: incréments de l'indice de réfraction des peptides/protéines

Le calcul de la masse de lipides adsorbé sur la surface de la cellule de mesure permet de retrouver l'aire moléculaire des lipides. Cette valeur peut être comparée avec des valeurs de la littérature afin de déterminer si la bicouche est correctement formée.

La masse de protéines calculée précédemment correspond à la quantité de protéines capable d'interagir avec la monocouche. Ce paramètre est suivi au cours du temps et permet d'étudier la cinétique de l'interaction.

Biréfringence d'une membrane adsorbée

Deux polarisations orthogonales, TE et TM, traversent le guide d'onde créant deux ondes évanescentes différentes sensibles à tout changement de l'indice de réfraction dû à la présence d'un film moléculaire.

En supposant que la masse déposée reste constante, la biréfringence peut être calculée. En effet, la biréfringence est une mesure de la différence entre l'indice de réfraction parallèle à la surface (η_e) et l'indice de réfraction perpendiculaire à la surface (η_o) (Figure 30).

Figure 1 de l'article (Lee *et al.*, 2010)

Figure 30 : La birefringence (Δn_f) d'une membrane supportée ordonnée (panneau supérieur) et désordonnée (panneau inférieur). η_e est l'indice de réfraction parallèle à la surface du capteur ; η_o est l'indice de réfraction perpendiculaire à la surface du capteur ; θ est l'angle entre l'axe optique de la couche et le chemin moyen des deux ondes évanescentes (en mode TM et TE). (Lee *et al.*, 2010)

La biréfringence rend compte de l'état dans lequel se trouve la membrane. Plus les phospholipides sont ordonnés, plus la valeur de biréfringence est élevée. Au contraire, plus la membrane est dans un état désordonnée, plus la valeur de biréfringence est faible. (Figure 30).

D'un point de vue global, nous avons utilisé l'épaisseur et la biréfringence pour définir la qualité de nos membranes déposées. Nous nous sommes alors focalisés sur les changements de biréfringence durant la fixation de la protéine car cela peut donner plus d'informations sur l'effet de la protéine sur la structure de la membrane et permet potentiellement la mise en évidence d'un mécanisme d'action.

Matériels et méthodes

Chapitre 1 : Matériels

1.1.Phospholipides

Parmi les phospholipides utilisés, la cardiolipine (CL) extraite de cœur de bœuf, le cholestérol et le dimyristoylphosphatidylsérine (DMPS) proviennent de Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Les phospholipides synthétiques dimyristoylphosphatidylglycérol (DMPG) et dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) proviennent de Fluka. La phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylglycérol (PG), extraits de jaune d'œuf, la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI) proviennent de lipids products.

La composition en chaînes acyles des différents lipides est donnée dans le tableau 6.

Acides gras	PC	PI	PE	PS	PG	CL
16:0	32,1	53,9	22	0,7	32,9	1
16:1	2,1			1,6	0,9	1
17:0				0,9		
18:0	11,7	0,3	37,4	33,3	12,2	
18:1	36,2	4,8	29,4	47	30,2	5,47
18:2	12,5	37,6	11,2	0,7	18,7	90,28
18:3		2,7		1,6		1
20:0				0,8		
20:1		0,1		13,4		
20:2		0,1				
20:3		0,1				
20:4	5,5				3,5	
20:5				1,4		
Others		0,4			1,6	1,25

Tableau 7 : Compositions en acides gras des différents phospholipides utilisés (Lipids Products et Sigma).

1.2.Protéines

La lactate déshydrogénase, la pyruvate kinase de muscle de lapin et le cytochrome *c* de coeur de boeuf proviennent de Sigma. La créatine kinase mitochondriale (CKmt) de lapin a été purifiée précédemment au laboratoire (Marciat *et al.*, 1999).

1.3.Sondes fluorescentes

Le Laurdan provient de Fluka. Le produit a été dissout dans le chloroforme à une concentration de l'ordre de 0,5 g/L. Une dilution de cette solution au 1/52 dans l'éthanol a permis de déterminer précisément cette concentration par mesure de l'absorbance à 360 nm, dans une cuve de 1 cm, en utilisant le coefficient d'extinction molaire de $18\,400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Weberet Farris, 1979) suivant la loi de Beer-Lambert.

La sonde acide 8-anilino-1-naphtalène sulfonique (ANS) provient de Sigma.

Chapitre 2 : Purifications des NDPK

2.1.Clonage de l'ADNc des NDPKs

Le gène nm23-H4 Δ 33 code la NDPK-D délétée de 33 résidus d'acides aminés correspondant à la séquence de localisation mitochondriale. Ce gène est inséré dans le plasmide pET28a(+) en aval d'une séquence codant une étiquette hexahistidine, et sous contrôle du promoteur T7 Lac, qui correspond au site de fixation de l'ARN polymérase T7. Ce plasmide est également pourvu d'un gène de résistance à la kanamycine, servant de marqueur de sélection positive et du gène Lac I, codant le répresseur Lac. Le clonage a été réalisé antérieurement au sein de la faculté de médecine Pierre et Marie Curie à Paris (Milon *et al.*, 2000). Les gènes nm23-H1 et nm23-H2 codent respectivement les NDPK-A et NDPK-B. Chacun des gènes est inséré dans un plasmide pET21, pourvu d'un gène de résistance à l'ampicilline. Les constructions plasmidiques sont un don du Professeur Lacombe.

Le vecteur ayant inséré le gène d'intérêt est ensuite utilisé pour transformer une souche d'*Escherichia coli* BL21(DE3). Cette souche lysogène pour le phage DE3 possède le gène de l'ARN polymérase T7 qui est régulé par le promoteur LacUV5. Ce dernier est sous contrôle de Lac I dont la répression est levée par addition d'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside).

2.2.Transformation de bactéries CaCl₂ compétentes

La croissance de bactéries *Escherichia Coli* BL21(DE3), dont l'absorbance à 600 nm est de 0,5-0,6, est stoppée par incubation 10 minutes dans la glace. Les bactéries sont alors centrifugées à 4 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est repris par 25 mL de MgCl₂ 100 mM froid et stérile et laissé à 0°C pendant 10 minutes puis centrifugé à 4000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est repris par 10 mL de CaCl₂ 100 mM froid et stérile et

laissé 1 heure dans la glace puis centrifugé à 4 000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est finalement resuspendu dans 500 µL de CaCl₂ 100 mM. 100 µL de cellules rendues compétentes sont incubées 20 minutes à 4°C avec 0,5 µL de vecteur. La solution est soumise à un choc thermique de 1 minute 30 à 42°C, puis les bactéries sont plongées 2 minutes dans la glace et incubées 1 heure à 37°C en présence de 150 µL de milieu LB. Pour finir, 100 µL sont étalés sur boîte de Pétri contenant de la kanamycine ou de l'ampicilline (5 µg/mL) afin de sélectionner les colonies transformées. La boîte est incubée pendant la nuit à 37°C, puis conservée à 4°C.

2.3.Surexpression des NDPKs

Un milieu liquide LB (100 mL) contenant 50 µg/µL de kanamycine ou ampicilline est ensemencé avec une colonie, pendant une nuit à 37°C, sous agitation. Le lendemain, 25 mL en sont extraits et introduits dans 1 L de milieu riche (2 % bactotryptone, 1 % extrait de levure, 0,5 % NaCl, 0,2 % glycérol, 50 mM K₂HPO₄) à 37°C, additionné de kanamycine ou ampicilline 5 µg/mL. L'absorbance à 600 nm est suivie jusqu'à une valeur de 0,5-0,6 et l'induction de la surexpression est réalisée par ajout d'IPTG 1 mM en concentration finale. La culture est incubée 6 h à 37°C, sous agitation, puis le milieu est centrifugé 30 min à 2000 g, à 4°C. Le culot bactérien est conservé à -80°C.

2.4.Extraction et purification

2.4.1.NDPK-A

Les cellules correspondant à 1 L de culture sont resuspendues dans 30 mL de tampon Tris-Acétate 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM pH 8 et sont cassées par sonication. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 20 400 g pendant 10 minutes (4°C).

La colonne 15Q, préalablement équilibrée dans le tampon de reprise des cellules, est chargée avec le surnageant puis est lavée avec un tampon Tris-Acétate 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM pH 7 afin d'éliminer les contaminants non retenus. L'élution est alors réalisée grâce à un tampon Tris-Acétate 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM pH 6,5.

Les échantillons contenant l'enzyme active sont rassemblés et passés sur colonne de dessalage PD10 pour changer le tampon dans lequel se trouve la protéine pour un tampon Tris 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4.

2.4.2.NDPK-B

Les cellules correspondant à 1 L de culture sont resuspendues dans 30 mL de tampon Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM pH 8,5 et sont cassées par sonication. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 20 400 g pendant 10 minutes (4°C).

Deux précipitations successives au sulfate d'ammonium sont alors réalisées à 60% de saturation puis 90% de saturation. Brièvement, le sel d'ammonium est ajouté à la solution protéique puis laissée incubée à température ambiante pendant 30 min, et centrifugée 35 min à 2 800 g, à 4°C.

Le culot correspondant à 90% de saturation est récupéré puis placé en dialyse contre du tampon Tris 50 mM EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, pH 8,5 pendant une nuit à 4°C.

La colonne DEAE-sephadex préalablement équilibrée dans du tampon Tris 50 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM pH 8,5 est ensuite chargée avec le dialysat obtenu. La colonne est lavée avec le même tampon d'équilibration. L'élution est réalisée par augmentation de la force ionique, par ajout de 10 mM MgCl₂.

Les échantillons contenant l'enzyme active sont rassemblés et passés sur colonne de dessalage PD10 afin d'éliminer les ions MgCl₂ et changer le tampon dans lequel se trouve la protéine pour un tampon Tris 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4.

2.4.3.NDPK-D

La NDPK-D recombinante est purifiée selon le protocole mis en place par Milon *et al.* (2000), avec quelques modifications.

Les cellules correspondant à 1 L de culture sont resuspendues dans 60 mL de tampon NaH₂PO₄ 20 mM pH 7,4 et sont cassées par sonication. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 20 400 g pendant 10 minutes (4°C).

La colonne Ni-NTA (Qiagen), préalablement équilibrée dans du tampon phosphate de sodium 20 mM, est chargée avec le surnageant puis est lavée avec un tampon NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 0,05 M, imidazole 30 mM pH 7,4 afin d'éliminer les contaminants non retenus ou ayant une faible affinité pour le nickel. L'élution est alors réalisée avec un gradient d'imidazole grâce à un tampon 20 mM, imidazole 750 mM pH 7,4.

Les échantillons contenant l'enzyme active sont rassemblés et dialysés pendant une nuit contre un tampon TrisHCl 20 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,2 mM pH 7,4 afin d'éliminer les ions et de diminuer la force ionique du milieu.

La pureté des protéines obtenues a été vérifiée par électrophorèse dénaturante discontinue en présence de SDS. La concentration en protéines a été déterminée par dosage de Lowry, modifié par Bensadoun et Weinstein (Bensadoun et Weinstein, 1976; Lowry *et al.*, 1951).

2.5. Test de l'activité NDPK

La mesure d'activité utilisée a été mise en place par Agarwal et Parks (1978) et est décrite dans la Figure 31.

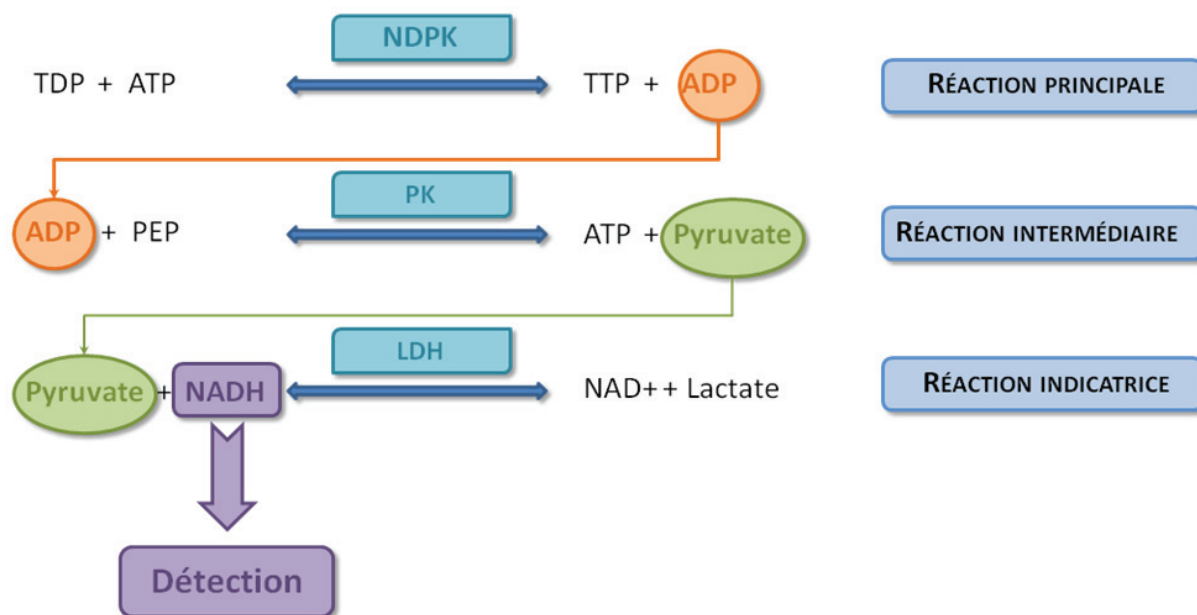


Figure 31 : Système enzymatique couplé permettant le test d'activité de la NDPK.

La mesure d'activité est réalisée en conditions saturantes de substrats (ATP 1 mM, PEP 1 mM, TDP 1 mM, NADH 0,1 mM, 5 U de Pyruvate Kinase et Lactate Déshydrogénase dans un 1 mL de tampon Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7,4). La mesure se fait à 340 nm pendant 3 minutes à 25°C.

L'activité en U/mL est alors calculée à l'aide de la formule suivante sachant qu'une unité d'enzyme convertit 1 µmole de TDP et d'ATP en TTP et ADP en une minute.

$$\text{Activité} = \frac{[|\Delta A_{340}/\text{min}|_{\text{Test}} - |\Delta A_{340}/\text{min}|_{\text{blanc}}] \times V_T \times Fd}{\epsilon_{\text{NADH}} \times l \times V_e}$$

$|\Delta A_{340}/\text{min}|_{\text{Test}}$: Valeur absolue de la pente de l'essai ;

$|\Delta A_{340}/\text{min}|_{\text{blanc}}$: Valeur absolue de la pente du blanc ;

V_T : Volume total d'essai (1 mL) ;

Fd : Facteur de dilution;

ε_{NADH} : coefficient d'extinction molaire du NADH ($6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ;

l : trajet optique (1 cm) ;

V_e : Volume d'essai (0,01 mL)

Chapitre 3 : Préparation des liposomes

3.1.Préparation des LUV

Plusieurs sortes de liposomes à 20 mg/mL ont été préparé :

- DMPC ou PC : soit globalement neutre.
- DMPC, DMPG (3 : 2) ou PC,PG (3 :2)
- PC, PE, CL (2 :1 :1). Cette composition mime la celle de la membrane interne de la mitochondrie.
- PC, PE, PS, PI, ch (12 :35 :22 :9 :22) : soit 30 % de charges négatives. Cette composition mime celle du feuillet interne de la membrane plasmique (Stahelin *et al.*, 2003).
- PC, PE, PS, PI (23 : 46 : 20 : 11).
- PC, PE, PS, ch (12 : 35 : 30 : 22)
- PC, PE, PI, ch (12 : 35 : 30 : 22)
- DMPC-DMPS (70 : 30), DMPC-DMPS-cholestérol (60 : 30 : 10)

Le mode préparatoire utilisé est l'extrusion. Les liposomes sont préparés à une température supérieure à celle de la température de transition de phase (T_m) des lipides utilisés. Comme la T_m des lipides de type PC, PE et CL est basse, leur préparation s'effectue à température ambiante. Dans le cas des lipides DMPC et DMPG, leur préparation est réalisée à une température supérieure, 30°C, puisque leur T_m sont respectivement de 23,7°C et 23,3°C.

Les phospholipides en solution chloroformique sont mélangés dans les proportions définies ci-dessus. Le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif ; les phospholipides sont remis en solution deux fois dans le chloroforme qui est évaporé, puis dans l'éther qui est également évaporé (cette étape est omise pour DMPC et DMPC-DMPG puisque ces phospholipides ne sont pas solubles dans l'éther).

Les phospholipides sont alors séchés pendant une nuit sous vide pour éliminer toute trace de solvant. Les films lipidiques obtenus sont ensuite hydratés dans 500 μL de tampon TrisHCl 20 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,4 suivi d'une agitation vortex pendant 10 minutes afin d'obtenir une suspension de vésicules multilamellaires (MLV).

Il s'en suit 6 cycles de congélation-décongélation : 5 minutes dans l'azote liquide, 10 minutes dans un bain-marie à 37°C et une minute d'agitation au vortex. Ce traitement diminue le nombre de couches de MLV (Mayer *et al.*, 1986).

Ensuite, on procède à l'extrusion à travers une membrane de polycarbonate de porosité 0,4 et 0,2 µm (MacDonald *et al.*, 1991). Un "mini extruder" constitué d'un filtre de polycarbonate maintenu dans un support (Avanti Polar Lipids, Allabaster, Etats-Unis) est utilisé. Après 19 passages successifs (nombre impair afin de récupérer la suspension du côté opposé à celui où elle a été injecté), la suspension de LUV de taille homogène (environ 140 nm) est récupérée.

3.2.Préparation des GUVs par hydratation douce

Pour obtenir des GUVs, les solutions de phospholipides sont mélangées dans les rapports molaires suivants : PC (23 %)-PE (45 %) -(NBD-PE 1%)- PS (30 %). Les solvants sont évaporés à sec dans un ballon de 50 mL, et les lipides sont repris par 980 µL de chloroforme et 150 µL de méthanol ; 7 mL de tampon Tris-HCl 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4, sont ajoutés lentement à la solution. Le solvant organique est ensuite éliminé à l'évaporateur rotatif à 40°C sous agitation.

La différence de température d'ébullition des deux solvants (61°C pour le chloroforme et 65°C pour le méthanol), conduit à deux phases d'ébullition. Après complète disparition des solvants (quelques minutes), une solution opalescente contenant des liposomes géants sont récupérés. Le pourcentage de GUV de cette solution est plus ou moins important selon les auteurs.

Chapitre 4 : Interaction protéines-liposomes

4.1.Adsorption des NDPKs

Chacune des protéines est incubée en présence de LUVs pendant 20 minutes à 25°C. La suspension est ensuite centrifugée une heure à 160 000 g en utilisant une centrifugeuse Airfuge. Le surnageant est récupéré, le culot est remis en suspension dans un volume de tampon Tris 20 mM pH 7,4, identique au volume du surnageant.

Le pourcentage de fixation est déterminé par le rapport :

$$\text{Pourcentage de fixation} = \frac{\text{activité}_{\text{culot}}}{\text{activité}_{\text{culot}} + \text{activité}_{\text{surnageant}}} \times 100$$

Dans les conditions choisies, la détermination de la fixation par le rapport des intensités de fluorescence dans les culots et surnageants donne les mêmes valeurs.

4.2.Fluorescence

Toutes les mesures de fluorescence ont été effectuées avec un fluorimètre Hitachi de type F4500, utilisant comme source lumineuse une lampe au Xénon de 150 watts, et possédant un monochromateur d'émission disposé à 90° du faisceau incident.

4.2.1.Fluorescence intrinsèque des tryptophanes

Des spectres d'émission sont tracés à une longueur d'onde d'excitation de 295 nm la largeur des fentes étant de 5 nm à l'excitation et à l'émission. Cette longueur d'onde permet d'étudier la fluorescence des résidus tryptophane des protéines et ainsi de déterminer l'effet de la fixation sur la structure tertiaire des protéines.

La détermination du maximum d'émission donne des indications sur l'environnement proche des résidus tryptophanes. Si le maximum est situé vers 350 nm, le tryptophane est dans un environnement hydrophile, comme l'eau. Par contre, si ce maximum est centré vers 320, l'environnement du résidu est hydrophobe.

4.2.2.Red Edge excitation Shift

Les mesures de fluorescence sont réalisées sur les culots NDPK-liposomes obtenus comme cités précédemment ou sur la protéine non fixée.

Les spectres sont mesurés à 25°C. Le maximum de la longueur d'onde d'émission est déterminé pour des excitations comprises entre 275 et 310 nm avec des intervalles de 5 nm.

4.2.3.Fluorescence extrinsèque : le Laurdan

Le Laurdan en solution chloroformique est mélangé avec les solutions de phospholipides PC-PE-CL, DMPC-DMPG, DMPC-DMPS, DMPC, PC-PE-PS-PI-ch et PC-PE-PS-PI. L'emploi des phospholipides saturés est préféré, car l'observation des changements d'état physique des phospholipides est plus facile à observer. En effet, la température de travail (37°C) est plus proche de leur température de transition de phase que de celle des lipides insaturés. Cependant, l'étude sur PC-PE-CL ou PC-PE-PS-PI +/-ch est réalisée car ce sont les systèmes les plus biomimétiques.

Le rapport molaire Laurdan-phospholipides est de 1/400. Les LUV, contenant le Laurdan, sont préparés comme indiqué précédemment, dans le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, EDTA 0,1 mM de manière à obtenir une concentration phospholipidique de 20 mg/mL. Les échantillons sont préparés et gardés à l'abri de la lumière.

Chacune des protéines est incubée en présence de liposomes contenant du Laurdan. Les culots liposomes-protéines sont obtenus comme décrits précédemment.

Des spectres 3D sont tracés avec les paramètres suivants :

- longueur d'onde d'excitation : de 320 à 420 nm avec 1 nm d'intervalle
- longueur d'onde d'émission : de 420 à 550 nm avec 1 nm d'intervalle
- ouverture des fentes : 5 nm à l'émission et à l'excitation

Les mesures sont prises après quelques minutes d'équilibre dans l'appareil, dans une cuve de 1 cm de trajet optique et thermostatée à 37°C.

4.2.3.1.Détermination des GPex en fonction de la température

Les mesures sont effectuées à différentes températures en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 360 nm pour une longueur d'onde d'émission allant de 420 nm à 550 nm. Pour chaque température, on note les intensités de fluorescence à 444 nm et 488 nm.

4.3.Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

En raison de la forte absorption de l'eau entre 1640 et 1650 cm^{-1} rendant difficile l'interprétation dans la région de la bande amide I, en particulier la détermination de la composition en hélices α et en feuillets β de la protéine, les milieux réactionnels utilisés sont préparés en utilisant un tampon deutéré Tris-HCl 20 mM $^2\text{H}_2\text{O}$ p ^2H 7,4.

Des échantillons de NDPK ont été lyophilisés et repris dans 7,5 μL de D_2O afin d'obtenir une concentration d'environ 5 g/L. Pour les mesures en présence de liposomes, des culots NDPK/vésicules ont été obtenus comme décrit précédemment et repris dans 7,5 μL de Tris-HCl 20 mM p ^2H 7,4.

L'échantillon est ensuite déposé entre deux fenêtres circulaires de BaF espacées de 56 μm par un espaceur en téflon. Les enregistrements sont réalisés par un spectromètre à transformée de fourier (IR-TF) Nicolet, dont l'air est asséché en permanence. Chaque spectre correspond à 256 interférogrammes ; la résolution est de 4 cm^{-1} . A chaque spectre est soustrait celui du tampon approprié ainsi que celui de la vapeur d'eau atmosphérique résiduelle. Chaque spectre présenté est le résultat d'au moins trois séries d'expériences indépendantes.

4.4. Etude de l'agrégation des liposomes par les NDPK

L'agrégation est étudiée en ajoutant des quantités croissantes de NDPK à une quantité fixe de liposomes (60 µg) dans 400 µL de tampon Tris-HCl 20 mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM. L'agrégation est suivie par lecture de la densité optique à 450 nm à 25°C. Des témoins sans protéine ou sans liposomes sont réalisés. L'influence de la force ionique sur l'agrégation est étudiée par ajout de différentes concentrations en NaCl (50, 75, 150 mM) au milieu réactionnel.

4.4.1. Visualisation de l'agrégation de GUVs

La solution de GUVs est diluée au 10^{ème} et incubée ou non avec 10 µg de NDPK-B pendant 30 min à 25°C.

10% de glycérol sont ensuite ajoutés avant dépôt sur lamelle et visualisation au microscope d'épifluorescence en utilisant un filtre FITC (excitation: 450-490 nm et émission: 500-550 nm).

4.5. Etude de l'interaction des protéines avec des monocouches

4.5.1. Langmuir

Une cuve d'un volume de 50 mL de sous-phase et 80 cm² de surface (Nima, UK) a été utilisée. Les parois intérieures de la cuve et les barrières sont en téflon. La vitesse de compression des barrières est de 6 cm²/min. La cuve est équipée d'un système de circulation d'eau qui maintient la sous-phase à une température constante de 21°C. L'ensemble du système est recouvert par une enceinte en plexiglas pour le protéger de la poussière. La sous-phase est composée de Tris-HCl 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4.

Les lipides ont été dissouts dans un mélange chloroforme : méthanol 4 :1 (v:v) à une concentration de 0,2 mg/mL. Le choix de ce mélange de solvant est lié à sa capacité à solubiliser les molécules de phospholipides utilisées. A l'aide d'une seringue, le volume souhaité de solution phospholipidique a été déposé à la surface du tampon par petites gouttes. Les molécules se répartissent sur toute la surface disponible entre les deux barrières complètement écartées, en formant une monocouche de Langmuir. Après évaporation du solvant, soit 20 minutes environ, la surface est comprimée jusqu'à la pression de surface voulue.

4.5.2. Microscopie à angle de Brewster (BAM)

Le microscope à angle de Brewster, modèle I-elli 2000, est commercialisé par NFT (Göttigen, Allemagne). Il est équipé d'un laser émettant une lumière polarisée à 532 nm qui est dirigée sur la surface d'une cuve de Langmuir à un angle proche de $53,1^\circ$ qui correspond à l'angle de Brewster. En présence d'un film interfacial, la lumière réfléchie est alors récupérée par un analyseur couplé à une caméra CCD. La résolution latérale du microscope est de $2\text{ }\mu\text{m}$.

Des expériences à aire constante sont réalisées sur un puit en Téflon d'un volume de 30 mL et une surface de 27 cm^2 . Les lipides dissouts dans un mélange chloroforme : méthanol 4 :1 (v:v) ont été déposés à la surface d'un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 jusqu'à obtenir des pressions de surface située entre 20 mN/m et 35 mN/m. Les différents échantillons de protéine ont été injectés après stabilisation de la pression de surface (entre 15 et 30 min selon la composition en phospholipides). La sous-phase n'était pas sous agitation.

Les images enregistrées ont une dimension de $430 \times 320\text{ }\mu\text{m}$. Cependant, comme l'inclinaison du faisceau incident est de 53° , les images sont déformées. Une correction géométrique est alors nécessaire : dans les images présentées la largeur a été multipliée par $\cos 53^\circ$.

Le paramètre qui quantifie la luminosité d'une image ou d'une région de l'image en BAM est appelé niveau de gris (NG). Plus le niveau de gris est élevé, plus l'image est lumineuse. En absence de film à l'interface air-eau, le niveau de gris enregistré n'est pas nul et correspond au bruit de fond dû à la diffusion, au niveau de base de la caméra, aux réflexions parasites... Par contre, en présence d'un film à l'interface, le niveau de gris augmente et l'image peut être saturée. L'obturateur de la caméra permet de sélectionner le temps d'exposition au faisceau réfléchi afin de s'adapter aux différents niveaux de luminosité et de ne pas endommager la caméra. Ainsi, les images ont été enregistrées avec différentes vitesses d'obturation, correspondant à différents temps d'exposition, allant de 1/50 à 1/250s. Pour pouvoir comparer les images enregistrées à différentes vitesses d'obturation, il est nécessaire de faire une calibration préalable de la caméra. A partir du niveau de gris mesuré, il est possible de calculer le paramètre de réflectance (R) également appelé intensité de lumière réfléchie. Ce paramètre tient compte des conditions particulières de l'expérience (diffusions parasites, réglages,...). Il est défini par la relation :

$$R = (\text{NG} - \text{BF}) \times F$$

NG : niveau de gris enregistré

BF : bruit de fond (déterminé lors de la calibration de la caméra)

F : facteur de calibration correspondant à la vitesse d'obturation choisie (déterminé lors de la calibration de la caméra).

A partir de cette valeur de R, il est possible d'estimer l'épaisseur de la monocouche pour un indice de réfraction connu.

$$R \propto \lambda d^2 n^2$$

Avec :

λ : longueur d'onde incidente

d : épaisseur du film

n : indice de réfraction

4.6. Dual polarisation interferometry

L'interféromètre Analight 4D, utilisé pour faire toutes les mesures de DPI, contient un capteur de mesure de modèle Anachip FB80 en oxynitrite de silicone. Le débit du tampon est contrôlé par une pompe Harvard Apparatus PHD2000 programmable et indépendante. Le tampon est composé de Tris 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4, pour la formation des bicouches lipidiques et changé pour un tampon Tris 20mM, EDTA 0,1mM pH 7,4 lors des expériences d'interaction lipides-NDPK-B.

Avant chaque série de manipulation, la puce est nettoyée par UV-ozone. Les propriétés optiques de la puce sont calibrées à 25°C en utilisant un mélange éthanol-eau 80% (m/m) puis sur le tampon dans lequel l'interaction se fait.

Une solution de liposomes (0,2 mg/mL final) est alors injectée à 15 μ L/min, à 25°C en présence de CaCl_2 5 mM, ce qui permet la formation d'une bicouche lipidique supportée. Une stabilisation de la bicouche pendant 30 min est nécessaire avant de changer le tampon pour le tampon Tris 20mM, EDTA 0,1mM pH 7,4. Lorsque le signal de la puce est stabilisé, 125 μ L de NDPK-B (1mM) sont injectés à un débit de 25 μ L/min pour observer les événements de fixation et sont suivis par un flux de tampon pendant 30 min.

Lorsque les expériences sont successives, la surface de la puce est nettoyée avec 2 % SDS et éthanol et une nouvelle bicouche est alors formée.

Les changements de l'épaisseur de la bicouche sont déterminés en fixant un indice de réfraction de la bicouche à une valeur de 1,47. Les données de masse et de biréfringence sont dérivées grâce au logiciel Analight® Explorer comme décrit dans (Lee *et al.*, 2010b). Le dépôt des bicouches a été suivi par mesure des changements des phases TM et TE en fonction des variations de masse et de l'évolution de la biréfringence. Le changement de biréfringence en

fonction de la masse de peptide fixée a alors été utilisé pour caractériser l'effet de la protéine sur la structure membranaire. Le DPI mesure la masse de lipides et de protéines par unité de surface (non affectée par le tampon environnant) avec une sensibilité haute et est également sensible à l'alignement des lipides (biréfringence).

Chapitre 5 : Comparaisons structurales des isoformes NDPK

Détermination de l'hydrophobicité des NDPK : ANS

L'ANS (acide 8-anilino-1-naphtalène sulfonique) est une sonde fluorescente extrinsèque qui possède un rendement quantique augmentant fortement avec l'hydrophobicité du milieu. Cette propriété a été utilisée afin de détecter l'exposition de zones hydrophobes des protéines.

Des quantités croissantes d'ANS 10 mM dans l'éthanol sont ajoutées à une solution de NDPK dans du tampon Tris 20 mM, EDTA 0.1 mM pH 7.4. Les mesures sont réalisées avec un fluorimètre Hitachi F4500 à 20°C. Les échantillons sont excités à 395 nm et le spectre d'émission est mesuré entre 400 et 550 nm. Les fentes d'excitation et d'émission sont 2,5 et 10 nm respectivement. Tous les spectres sont corrigés par le tampon contenant la même concentration en ANS. L'hydrophobicité apparente de chaque échantillon est exprimée comme l'aire mesurée sous la courbe.

Résultats/discussion

Chapitre 1 : Interaction de la NDPK-D avec les phospholipides de la membrane interne de la mitochondrie (Article 1, publié dans BBA biomembrane)

Parmi les NDPK, la NDPK-D est la seule isoforme à présenter une séquence de localisation mitochondriale. Il a été montré récemment que cette protéine est capable de fixer et de ponter les membranes mitochondriales suggérant son implication dans la formation de sites de contact et dans la structuration de l'espace intermembranaire de la mitochondrie (Lacombe *et al.*, 2009; Tokarska-Schlattner *et al.*, 2008). Pour comprendre plus en détail l'effet de la NDPK-D sur l'organisation des lipides de la membrane interne de la mitochondrie, dans l'article qui suit, nous avons étudié et caractérisé par spectroscopie de fluorescence, FTIR et microscopie à l'angle de Brewster, les modifications provoquées par l'interaction de la NDPK-D avec des membranes dont la composition mime celle de la membrane interne de la mitochondrie et avec des membranes zwitterioniques.

Nous avons montré que la NDPK-D est capable d'interagir non seulement avec des membranes de type PC-PE-CL, chargées négativement, mais également avec des membranes constituées uniquement de PC. Nous avons également déterminé que la nature de la tête polaire ainsi que la composition des chaînes acyles n'ont aucune influence notable sur cette fixation et que la force ionique réduit la quantité de NDPK-D sans jamais annuler sa fixation. Il semble donc que la nature de l'interaction protéine-membrane implique des interactions électrostatiques mais également hydrophobes.

Les mesures de fluorescence des tryptophanes de la NDPK-D (excitation à 295 nm) montrent un déplacement du maximum d'émission indiquant que la structure tertiaire de la protéine est affectée suite à sa fixation aux membranes, et ce quelle que soit leur charge. L'implication d'un ou plusieurs tryptophanes dans la fixation de la protéine aux membranes explique les résultats de fixation obtenus.

L'analyse des spectres infrarouges apporte des précisions à ces résultats. Un remodelage des structures secondaires a été mis en évidence et interprété comme une augmentation du pourcentage d'hélices au détriment des structures apériodiques et des feuillettes β .

Les modifications de l'état d'hydratation des phospholipides saturés et insaturés ont été suivies par spectroscopie de fluorescence en utilisant une sonde membranaire sensible à la polarité de l'environnement, le Laurdan. Les résultats indiquent la capacité de la NDPK-D à diminuer l'état d'hydratation, qui rend compte de la fluidité membranaire, des membranes chargées négativement (PC-PE-CL et DMPC-DMPG). De manière intéressante, bien que la protéine soit capable d'interagir avec les membranes zwitterioniques, aucune modification de l'état d'hydratation des phospholipides n'est observée.

L'analyse des spectres infrarouges dans la région des esters ($1740\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$) et des groupements phosphates (1090 cm^{-1}) indique que l'association de la protéine à la membrane se traduit par une baisse de l'état d'hydratation de ces groupements, quelle que soit la charge de la membrane. L'analyse des spectres infrarouges dans la région des chaînes acyles ($2950\text{-}2820\text{ cm}^{-1}$) ne montre aucune modification lorsque la membrane est zwitterionique. Lorsque la membrane contient un phospholipide anionique, une fluidification des chaînes est observée. Ce résultat semble en contradiction avec l'effet illustré avec le Laurdan et les mesures de GP. Une telle différence peut s'expliquer par le fait que le groupement fluorescent du Laurdan est localisé au niveau du squelette glycérol des phospholipides (Chonget Wong, 1993), et que les résultats obtenus ne rendent compte que des changements de solvant dans cette région de la bicouche.

Des images de microscopie à angle de Brewster sur des monocouches de compositions phospholipidiques différentes, montrent l'apparition de domaines brillants au sein de membranes contenant de la cardiolipine suite à l'injection de la NDPK-D dans la sous phase. Ces domaines n'apparaissent pas lorsque la membrane est zwitterionique. Nous en avons alors déduit que la formation de ces domaines protéolipidiques requiert la présence de la CL.

Titre : New insights into lipid- Nucleoside Diphosphate Kinase -D interaction mechanism: protein structural changes and membrane reorganization

Auteurs : Francois-Moutal L., Maniti O., Marcillat O., Granjon T.

[Biochim Biophys Acta](#). 2013 Feb;1828(2):906-15. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.08.023. Epub 2012 Sep 2.

Résumé :

Les NDPKs n'ont longtemps été considérées que pour leur activité enzymatique. La découverte du gène nmel, un gène antimétastatique codant la NDPK-A, a conduit la communauté scientifique à réévaluer leur rôle dans la cellule. Il est désormais établi que la famille NDPK est bien plus complexe que de prime abord, et malgré la quantité croissante de données suggérant le rôle multifonctionnel de ces protéines, les fonctions spécifiques de chaque membrane sont encore évasives. Parmi ces isoformes, la NDPK-D est la seule à présenter une séquence de localisation mitochondriale. Il a été montré récemment que cette protéine est capable de fixer et de ponter les membranes mitochondriales ; suggérant que la NDPK-D pourrait être impliquée dans les sites de contacts et contribuer à la structuration de l'espace intermembranaire. Afin de mieux comprendre l'influence de la NDPK-D sur l'organisation lipidique mitochondrial, nous avons analysé son comportement dans différents environnements lipidiques. Nous avons montré que la NDPK-D n'interagit pas seulement avec la CL ou des phospholipides zwitterioniques mais est également capable de fixer d'une manière non négligeable la PC zwitterionique. La NDPK-D modifie l'organisation membranaire en terme de fluidité, hydratation et organisation latérale (clustering), et ce en fonction de la structure des lipides. Des changements de structure de la protéine après fixation aux lipides ont été mis en évidence par spectroscopie de fluorescence et infrarouge, et ce quelle que soit la composition de la membrane. En prenant en compte tous ces éléments, un mécanisme d'interaction entre la NDPK-D et des lipides anioniques ou zwitterioniques a été proposé.

Chapitre 2 : Comparaison de l'effet de la fixation de la NDPK-D sur l'organisation et l'état physique des lipides des membranes mitochondriales avec deux autres protéines de l'espace intermembranaire : la CKmt et le cytochrome c

2.1. Rappels bibliographiques

2.1.1. Cytochrome *c*

Le cytochrome *c* (Cyt *c*) est une hémoprotéine essentielle, qui agit comme un transporteur mobile d'électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire, et qui est associé à la face externe de la membrane interne de la mitochondrie.

La protéine est globalement sphérique, avec un diamètre de 3,4 nm. Elle présente peu d'hélices et aucun feuillet β (Bushnell *et al.*, 1990). Le cœur de la molécule est hydrophobe et sa surface est chargée positivement, ce qui en fait une protéine hautement basique.



Figure 32 : Structure du cytochrome c humain (code PDB : 1J3S).

Le cytochrome *c* est adsorbé à la membrane interne de la mitochondrie via des interactions spécifiques avec la CL (Tuominen *et al.*, 2002), par une attraction électrostatique. Une des chaîne hydrocarbonée de la cardiolipine est alors susceptible de s'insérer dans la structure du Cyt *c* mettant en évidence un mécanisme séquentiel : une reconnaissance électrostatique initiale suivie d'une interaction hydrophobe (Tuominen *et al.*, 2002). Des changements conformationnels de la protéine ancrée de manière hydrophobe à des membranes contenant de la CL ont été mis en évidence (Balakrishnan *et al.*, 2007; Cortese *et al.*, 1998). Ces changements de conformation altèrent le potentiel redox et la réactivité de l'hème et seraient importants pour la fonction du Cyt *c* (Basova *et al.*, 2007). Plus récemment, Beales et ses collaborateurs (2011), ont montré la capacité du cytochrome *c* à provoquer des modifications remarquables de morphologie dans les portions contenant de la CL de GUVs latéralement hétérogènes (Beales *et al.*, 2011).

2.2.2. Créatine kinase mitochondriale (CKmt)

Par son action sur la transformation réversible de la créatine en phosphocréatine, la créatine kinase (CK), EC 2.7.3.2, contrôle le métabolisme énergétique dans la cellule.

La CK, enzyme de la famille des guanidino kinases, existe sous plusieurs isoformes : cytosoliques et mitochondriales.

L'isoforme mitochondriale de la CK, appelée CKmt, joue un rôle important dans le transport de l'ATP depuis la matrice vers le cytosol via la navette phosphocréatine (cf Figure 33), selon le mécanisme suivant :



Dans le concept de microcompartimentation fonctionnelle (Gellerich *et al.*, 1987), l'ATP produit par la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie est exporté par l'ANT. L'ATP est ensuite conduit au site actif de la CKmt pour la transphosphorylation en phosphocréatine (PCr). La porine VDAC (canal anionique voltage dépendant) va permettre le passage de la phosphocréatine dans le cytosol. L'ADP retourne vers la matrice via l'ANT (translocateur des nucléotides adényliques) afin d'être utilisé lors de la phosphorylation oxydative (Schlattner *et al.*, 2005) (cf figure 33).

Figure 4 de l'article (Schlattner *et al.*, 2005).

Figure 33 : La microcompartimentation fonctionnelle. Le complexe protéolipidique permet un échange direct des substrats et produits de la CKmt (transport des substrats et métabolites est traduit par des flèches) où Cr est la créatine, PCr la phosphocréatine. Tiré de (Schlattner *et al.*, 2005).

La CKmt serait également impliqué dans la mort cellulaire puisqu'elle ferait partie du pore de transition de perméabilité (PTP) avec VDAC et ANT (Beutner *et al.*, 1998).

La CK existe sous deux formes stables interconvertibles : un dimère et un octamère (Schlegel *et al.*, 1988). Sous forme octamérique, et seulement sous cette forme, elle est localisée sur la face externe de la membrane interne des mitochondries (Marcillat *et al.*, 1987). Elle n'est pas distribuée de manière uniforme à la surface de la membrane, mais est localisée en concentration importante au niveau des sites de contact entre les membranes externe et interne (Kottke *et al.*, 1991).

L'octamère de la CKmt est un parallélépipède de 93 x 93 x 86.8 Å. Il est constitué de 4 dimères en forme de bananes, organisés autour d'un axe de symétrie central. Les 4 faces

latérales sont identiques, mais différentes des faces inférieure et supérieure. Ces deux dernières sont identiques entre elles.



Figure 34 : Structure octamérique de la CKmt sarcomérique de poulet, en vue latérale (code PDB : 1crk). La partie haute de la protéine est bleu, la partie basse en rouge.

Ces faces opposées contiennent chacune quatre domaines basiques identiques qui seraient à l'origine de la fixation à la membrane. En effet, des études avec des liposomes de composition variable ont permis d'établir que la fixation de l'enzyme à la membrane était favorisée par la présence de phospholipides anioniques, en particulier la cardiolipine (Vacheron *et al.*, 1997). De plus, la mutagenèse dirigée des résidus de lysine de l'extrémité C-terminale, Lys379, Lys380 et Lys 369, supposés être impliqués dans l'interaction, diminue la fixation de plus de 90% (Schlattner *et al.*, 2004). Ces résidus chargés sont exposés sur les faces supérieure et inférieure du cube octamérique, la fixation à la membrane se fait par l'intermédiaire de ces deux faces.

Il a également été montré, par la technique de Langmuir couplée à la microscopie à angle de Brewster, que l'octamère présente des régions hydrophobes exposées puisqu'il est capable de s'adsorber à l'interface air-tampon. Ainsi, en plus des interactions électrostatiques, des interactions hydrophobes sont impliquées dans la fixation de la CKmt à la membrane mitochondriale (Vernoux *et al.*, 2006). L'interaction de la CKmt avec les membranes se déroule en deux temps :

- une première de concentration et d'adsorption de la protéine à la surface via des interactions électrostatiques
- suivie par des changements de conformation de la CKmt permettant la pénétration de zones hydrophobes mobiles au sein des phospholipides.

L'analyse des spectres infrarouge de la CKmt adsorbée montre une modification des structures secondaires de la protéine suite à son interaction avec la membrane (Granjon *et al.*, 2001). Des mesures de spectroscopie type PM-IRRAS (spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption par modulation de polarisation) ont montré que l'interaction avec des monocouches affecte la structure de l'octamère de CKmt et plus particulièrement l'orientation d'une boucle contenant des hélices α (Maniti *et al.*, 2009)

La fixation de la CKmt aux liposomes contenant des phospholipides chargés négativement (CL ou PG) induit des changements d'état physique des lipides (Granjon *et al.*, 2001). En effet, les mesures de fluorescence du Laurdan indiquent que l'adsorption de l'enzyme à la surface des vésicules change leur état physique en élargissant la transition de phase des phospholipides. L'analyse des spectres infrarouges montre un déplacement des bandes caractéristiques des groupements CH_2 des phospholipides, correspondant aux chaînes acyles, indiquant une conformation moins flexible des chaînes qu'en absence de protéine à la même température. La fixation de la CKmt a donc tendance à rigidifier la membrane.

De plus, il a été montré récemment que la CKmt possède aussi un rôle structural en participant au maintien de la morphologie mitochondriale et en induisant la ségrégation de la cardiolipine dans des modèles biomimétiques (Lenz *et al.*, 2007; Maniti *et al.*, 2009).

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence que la fixation de la NDPK-D sur des membranes contenant de la CL, avait également pour conséquences une modification de l'organisation lipidique de ces membranes. Bien que ces deux kinases soient phylogénétiquement distinctes, elles partagent un certain nombre de propriétés. Ces protéines se présentent toutes les deux comme des homo-oligomères présentant une symétrie d'ordre 2, qui se fixent à la cardiolipine par leur faces symétriques. Elles sont également capables d'utiliser l'ATP afin de maintenir des concentrations adaptées des différents nucléotides. Les données de profil d'expression montrent que les taux d'expression de la NDPK-D et la CKmt sont inversés (Lacombe *et al.*, 2009). En particulier dans le foie, la NDPK-D est présente à un taux relativement élevé alors que la CKmt est pratiquement absente.

Dans le but de déterminer si toutes les protéines de l'espace intermembranaire sont capables d'avoir les mêmes effets sur l'organisation latérale des phospholipides, nous avons étudié les effets de la fixation du cytochrome *c*, protéine la plus abondante de l'espace intermembranaire également capable de se fixer à la CL et dont le mode de fixation est très proche de celui des deux enzymes citées précédemment, sur l'organisation de membranes

contenant de la CL et nous les avons comparé avec ceux obtenus en présence de créatine kinase mitochondriale (CKmt) et NDPK-D.

2.2.Résultats

Nous avons tout d'abord comparé les fixations des trois protéines sur des liposomes zwitterioniques (DMPC) et des liposomes contenant une charge négative nette (PC-PE-CL et DMPC-DMPG). Les quantités de protéines utilisées sont telles que les surfaces protéiques disponibles sont égales. Les résultats sont montrés sur la Figure 35.

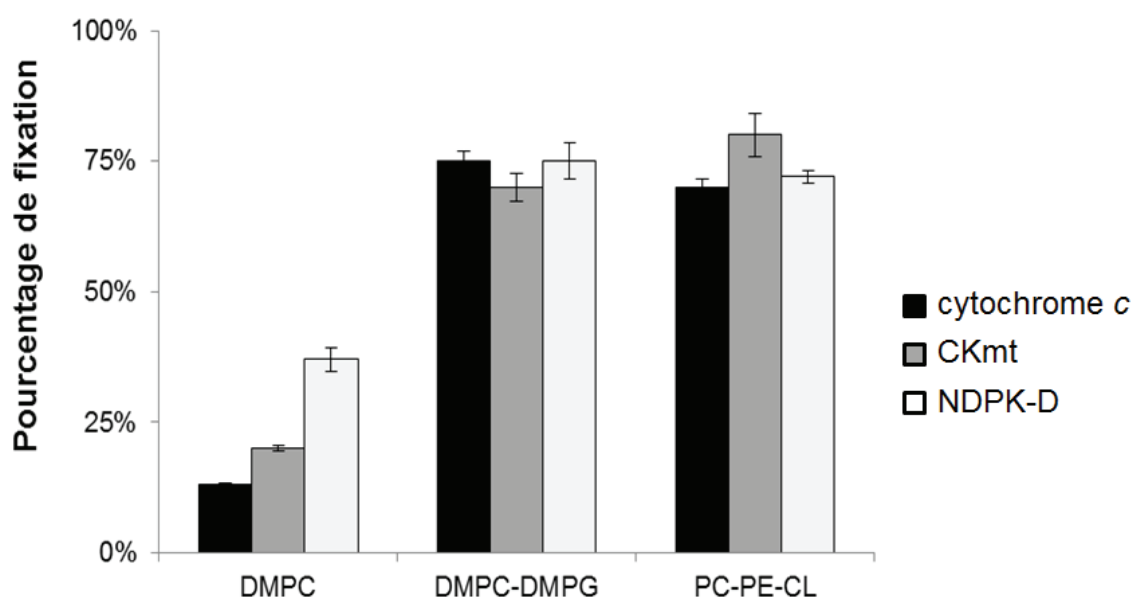


Figure 35 : Pourcentages de fixation de 3 μ M de cytochrome *c* (noir), de 0,4 μ M CKmt (gris) et de 0,8 μ M NDPK-D (blanc) sur 150 μ g de liposomes de compositions différentes. Ces trois concentrations en protéines correspondent à une surface protéique accessible égale. Les résultats ont été réalisés trois fois et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type.

Les résultats montrent un pourcentage de fixation d'environ 70-80 % des trois protéines sur les liposomes chargés négativement DMPC-DMPG (3 :2) et PC-PE-CL (2 :1 :1). Une fixation résiduelle du cytochrome *c* et de la CKmt est également observée avec les liposomes globalement neutres, (13 % et 20 % respectivement) alors que la NDPK-D se fixe à près de 40 % sur ce type de structures.

La NDPK-D est capable de se fixer quelle que soit la charge de la membrane, en présence ou non d'une force ionique, même si celle-ci réduit la quantité de protéine adsorbée. Dans le cas du cytochrome *c* et la CKmt, la fixation à une membrane zwitterionique est moins importante que celle de la NDPK-D et la présence de NaCl 150 mM, empêche leur interaction avec les membranes. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature

(Cortese *et al.*, 1998; Vacheron *et al.*, 1997) et indiquent que la contribution de la composante hydrophobe est plus importante dans l'interaction de la NDPK-D avec les membranes que pour les autres protéines puisqu'une augmentation de la force ionique du milieu n'empêche pas la fixation de la NDPK-D contrairement aux deux autres protéines.

Le Laurdan a ensuite été utilisé afin d'apprécier l'effet de la fixation des trois protéines mitochondriales étudiées sur l'organisation des lipides. Les protéines d'intérêt sont incubées avec les liposomes contenant le Laurdan, les fractions contenant les protéines adsorbées sur les liposomes et les liposomes libres sont séparées par centrifugation. Il est à noter que la présence du Laurdan ne perturbe pas l'interaction des protéines avec les membranes puisque les pourcentages de fixation sont identiques à ceux obtenus en absence de la sonde (non montré). Les spectres de fluorescence sont alors enregistrés dans les conditions décrites précédemment dans matériels et méthodes.

Le calcul du paramètre GP, décrit dans rappels bibliographiques, permet de quantifier l'état physique des membranes et ainsi de comparer l'effet de la fixation des trois protéines.

Le ΔGP_{exc} est défini selon la relation :

$$\Delta GP_{exc} = GP_{(prot+liposome)} - GP_{(liposomes\ seuls)}$$

C'est un moyen de représentation qui permet une lecture et une comparaison directe des résultats.

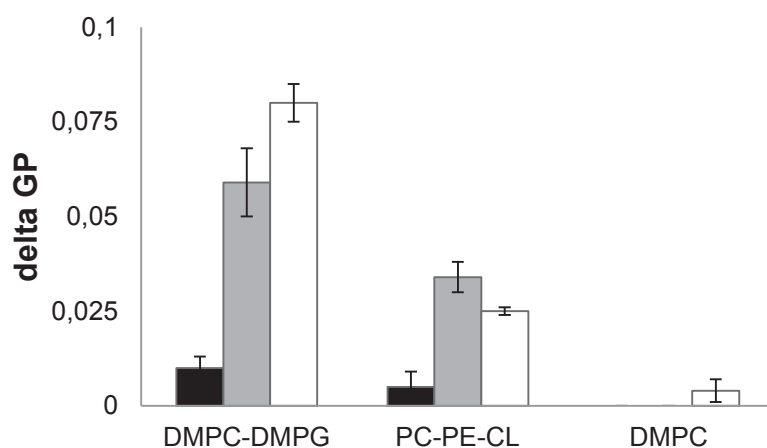


Figure 36 : Variations du GP d'excitation induit par la fixation du cytochrome c (noir), de la CKmt (gris) et de la NDPK-D (blanc). Seul l'effet de la NDPK-D a été étudié sur DMPC puisque seule cette protéine se fixe de manière importante. Les résultats ont été réalisés trois fois et les barres d'erreurs correspondent à l'écart type.

Le ΔGP_{exc} du Laurdan en présence de cytochrome *c* est faible dans le cas des liposomes PC-PE-CL et DMPC-DMPG. L'effet de cette protéine sur l'état physique des membranes est négligeable.

Dans le cas des deux kinases mitochondriales, le ΔG_{Pexc} est beaucoup plus important que celui mesuré avec le cytochrome *c*. De plus, l'effet de ces deux enzymes sur l'état physique des lipides est indépendant de la tête polaire mais dépend de la charge portée par la membrane.

Bien que la CL soit un partenaire privilégié au sein des membranes des deux enzymes, l'effet des protéines sur l'état physique des vésicules PC-PE-CL est plus faible que celui observé sur les liposomes DMPC-DMPG. Les phospholipides utilisés présentent des compositions en chaînes acyles différentes : les phospholipides saturés DMPC et DMPG présentent une température de transition de phase plus élevée (23°C) que celle des phospholipides naturels extraits (PC, PE, CL) composés principalement de chaînes insaturées. Ainsi, à 37°C, les phospholipides à chaînes saturées sont dans un état moins fluide que ceux à chaînes insaturées. L'état physique des phospholipides DMPC et DMPG est alors plus sensible à l'effet d'une protéine que PC, PE et CL.

Bien que la NDPK-D se fixe à environ 30 % sur les liposomes DMPC (voir figure 46), le ΔG_{Pexc} dans ces conditions est proche de zéro, indiquant une absence de modification de l'état physique des membranes.

Comme les trois protéines ont des effets différents sur l'état physique des membranes, nous avons alors comparé les effets de la fixation des protéines mitochondriales sur la morphologie de films monomoléculaires de phospholipides à l'interface air/eau par microscopie à l'angle de Brewster. Cette microscopie permet une visualisation directe des variations de l'organisation des molécules présentes à la surface.

Comme décrit dans l'article sur la NDPK-D, l'injection de la protéine dans la sous phase d'une monocouche de CL à environ 30 mN/m induit la formation de points brillants que nous avons interprété comme des complexes protéolipidiques (voir figure 8 de l'article 1 sur la NDPK-D). Ces domaines sont nombreux et présentent une morphologie circulaire.

Lorsque la CKmt est injectée à 4 nM, comme décrit dans la littérature (Maniti *et al.*, 2009), des domaines de type fractal, différents de ceux observés avec la NDPK-D, sont observés.

L'injection de 4 nM de cytochrome *c* dans les mêmes conditions, n'induit qu'une faible modification de la morphologie de la monocouche de CL. Quelques points brillants apparaissent au bout d'une heure mais ils sont très différents en taille et en nombre de ceux observés en présence de la CKmt et de la NDPK-D (Figure 37).

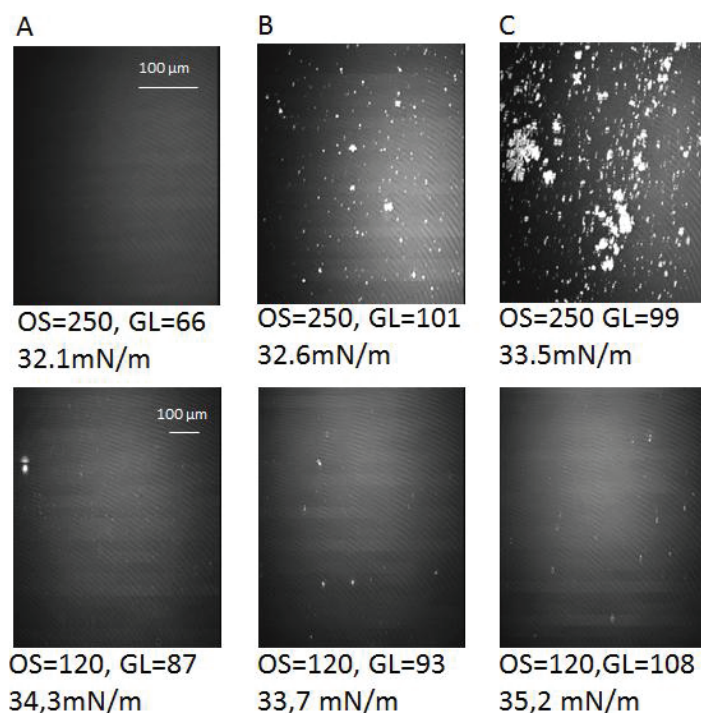


Figure 37 : Images de BAM de 4 nM de CKmt (panneau du haut) ou du cytochrome *c* (panneau inférieur) sur des monocouches de CL. A= avant injection. B = après 60 min, C = après 100min.

Le cytochrome *c* est alors injecté à des concentrations plus importantes sous une monocouche de CL. Les résultats sont montrés Figure 38.

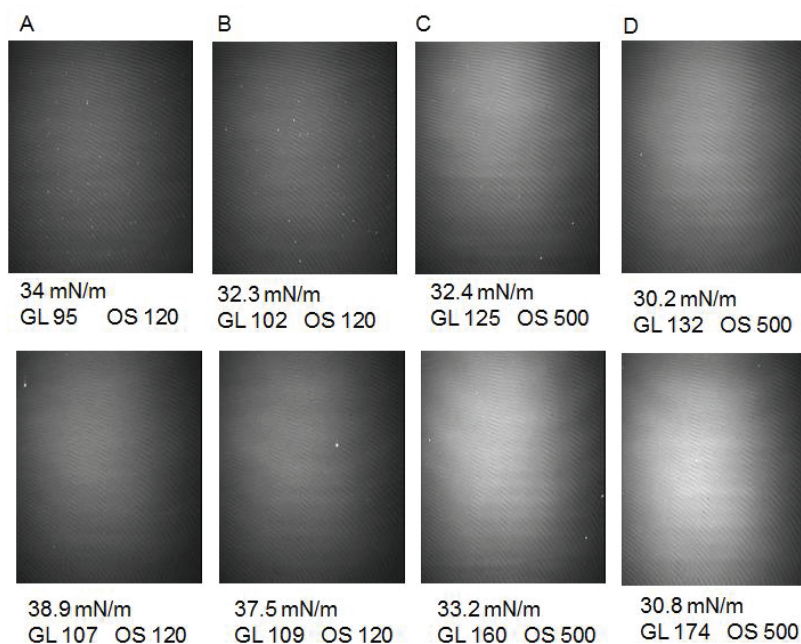


Figure 38 : Images de BAM du cytochrome *c* (85 μM, panneau supérieur ou 333 μM, panneau inférieur) sur des monocouches de CL. A= avant injection. B = après 15 min, C = après 60min, D = après 90min.

Les panneaux A de la Figure 38 montrent la morphologie homogène de la monocouche à une pression d'environ 36 mN/m en absence de cytochrome *c*.

Lorsque la protéine est injectée, et ce quelle que soit la concentration utilisée, 85 ou 333 μ M, une augmentation du niveau gris global, reflet de l'épaisseur du film interfacial, est observée (panneaux B, C et C de la Figure 38). Ceci est dû à l'arrivée de la protéine à l'interface lipide-tampon. Après 90 minutes, aucune modification de morphologie des images n'est observée, les monocouches restent homogènes.

2.3.Discussion

Par analogie avec ce qui a été montré pour la membrane plasmique, on peut penser que l'organisation des lipides des membranes mitochondriales, et plus précisément de la membrane interne, joue un rôle important. Par exemple, il a été suggéré récemment que la formation de plateformes de cardiolipine permet l'activation de la caspase 8, une enzyme impliquée dans l'initiation de la phase effectrice de l'apoptose (Jalmar *et al.*, 2013).

Les résultats obtenus montrent que les fixations de la CKmt, du cytochrome *c* et de la NDPK-D ont des conséquences différentes sur l'état physique des membranes et l'organisation des phospholipides au sein de monocouches.

L'interaction de la CKmt résulte en une diminution de l'hydratation des chaînes acyles des phospholipides observée en spectroscopie infrarouge (Granjon *et al.*, 2001), alors que la NDPK-D induit une augmentation de la mobilité des chaînes. Ainsi, bien que la compaction des lipides induite par la CKmt et la NDPK-D, appréciée par fluorescence du Laurdan, semble similaire, le degré de liberté des chaînes acyles est plus grand en présence de NDPK-D. Ceci pourrait être en lien avec un degré de pénétration différent des deux protéines dans les membranes.

La NDPK-D, capable de se fixer via des interactions électrostatiques et hydrophobes, provoque la formation de domaines protéo-lipidiques, observés par microscopie à angle de Brewster, comme dans le cas de la CKmt. Dans les deux cas, ces domaines sont de taille importante et sont probablement formés par des réseaux de protéines associés aux lipides. Ces interactions protéines-protéines, mettant en jeu la CKmt, ont été montrées par spectroscopie infrarouge et impliquent la présence de feuilletts β intermoléculaires non agrégés. On peut noter d'une part que la CKmt représente environ 10% en masse des protéines de l'espace intermembranaire et d'autre part que la formation d'agrégats intramitochondriaux de CKmt ont été observés *in vitro* (Vacheron *et al.*, 1997) et dans des modèles cellulaires (Stadhouders, Jap *et al.* 1994)(O'Gorman, Piendl *et al.* 1997).

D'un point de vue biologique, les domaines protéo-lipidiques induits par la CKmt résultent en une réorganisation lipidique spatio-temporelle de la CL et seraient susceptibles d'influencer les processus physiologiques impliquant ce phospholipide, comme l'apoptose, la phosphorylation oxydative... Au vu de la quantité de CKmt présente dans les mitochondries de cœur, l'interaction de cette protéine avec la CL pourrait avoir un effet sur la répartition de ce phospholipide, impliqué dans plusieurs fonctions mitochondriales fondamentales.

Dans le cas de la NDPK-D, des interactions protéines-protéines impliquant des feuilletts β intermoléculaires n'ont pas été montrées (voir figure 2 de l'article 1). A ce stade nous n'avons aucune indication que cette protéine forme des interactions protéines-protéines aussi marquées que la CKmt, ce qui explique peut-être la taille plus petite des domaines observés par BAM.

En ce qui concerne le cytochrome *c*, son mode de fixation est proche de celui de la CKmt : adsorption électrostatique puis pénétration au sein de la membrane (Tuominen *et al.*, 2002). Cependant, au vu des résultats de microscopie à l'angle de Brewster et de fluorescence du Laurdan, la fixation de la protéine à la cardiolipine, ne se traduit pas par la formation de réseaux comme ceux observés dans le cas de la CKmt ou de la NDPK-D.

Les conséquences biologiques de l'interaction de protéines de surface avec les membranes mitochondriales restent très mal connues. La CKmt existe sous deux formes oligomériques stables et interconvertibles : octamérique et dimérique (Schlegel *et al.*, 1988). La dissociation de l'octamère en dimères est favorisée lorsque la quantité en substrats augmente. De ces deux formes, seul l'octamère de la CKmt est capable de s'adsorber à la membrane interne de la mitochondrie (Marcillat *et al.*, 1987).

Cette interconversion, paraît liée à l'état énergétique dans lequel se trouve la mitochondrie, pourrait correspondre à un autre niveau de régulation dans la réorganisation de la CL (Wyss, Smeitink *et al.* 1992). Par exemple, dans les cellules de cœur, où les besoins énergétiques sont très variables, deux cas de figure extrêmes peuvent être distingués Figure 39.

- Lorsqu'il y a un fort besoin en ATP, le nombre de points de contact mitochondriaux augmente. Ces conditions correspondent à une forme octamérique dominante de la CKmt. Cet octamère se fixe sur la CL de la membrane interne, il a été proposé que cette enzyme participe à la formation de points de contacts (Lenz *et al.*, 2007). Nos résultats pourraient indiquer que cette protéine a tendance à former des domaines de CL de grande taille. Une variation de la

concentration locale en CL pourrait avoir une influence sur les fonctions mitochondriales dans lesquelles ce phospholipide est impliqué, comme le rapprochement des complexes de la chaîne respiratoire, la fixation du cytochrome *c* sur la membrane interne, la colocalisation des complexes de la chaîne respiratoire avec le transporteur des nucléotides adényliques (ANT). Ces conditions pourraient être associées à une production maximale d'ATP au niveau des sites utilisateurs cytoplasmiques .

- Lorsqu'il y a un faible besoin en ATP, les points de contacts mitochondriaux sont moins nombreux. L'abondance de ses substrats favorise la forme dimérique de la CKmt qui n'est pas capable de se fixer aux membranes. Dans ces conditions, cette protéine ne serait plus capable de former des points de contact, ni de domaines enrichis en CL. La concentration locale de ce phospholipide diminue, et on sait que dans ces conditions le cytochrome *c* se décroche puisqu'il y a compétition entre la CL et l'ATP (Rytomaa *et al.*, 1992), présent en grandes quantités locales.

Dans les cellules de foie, où la NDPK-D est présente en grandes quantités, les besoins en énergie sont beaucoup moins variables. Ainsi, une telle dynamique paraît plus difficile à concevoir. Et si elle existe, les données sur la NDPK-D sont largement insuffisantes pour la mettre en place.

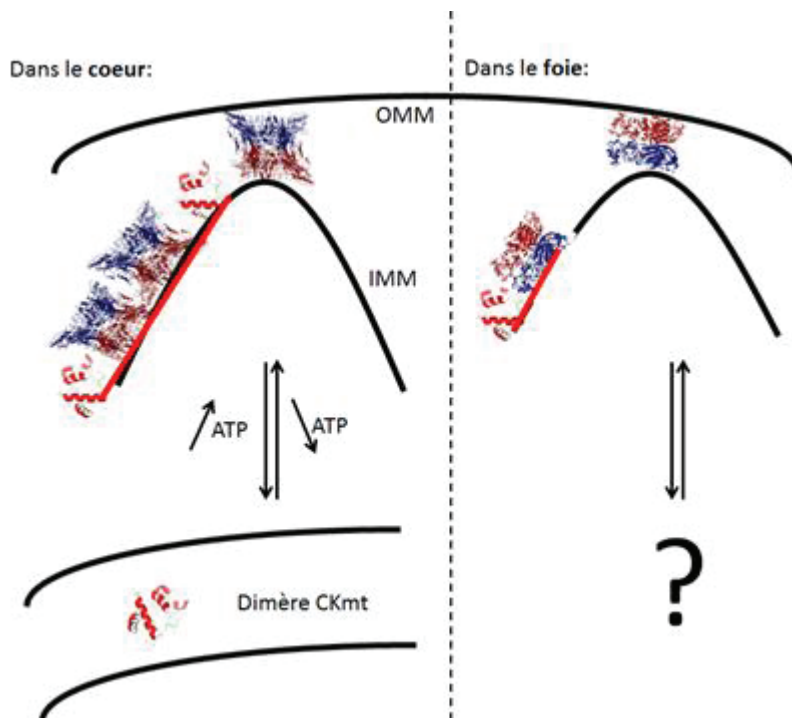


Figure 39 : Modèle hypothétique mettant en jeu la CKmt et la NDPK-D.

L'ensemble de ces résultats est compatible avec l'hypothèse selon laquelle la NDPK-D et la CKmt pourraient jouer des rôles similaires dans le maintien de la structure mitochondriale. Il est intéressant de noter qu'une différence de forme des mitochondries de foie (où seule la NDPK-D est exprimée) et de cœur (CKmt) ont été décrites (Forner *et al.*, 2006) : les crêtes mitochondriales sont plus nombreuses au niveau du cœur qu'au niveau du foie. Si ces deux protéines sont des facteurs clés dans la structuration de la mitochondrie, de par leur capacité commune à fixer les membranes via leurs deux faces opposées et à former des complexes protéolipidiques, les comportements différents au niveau de la membrane, de ces deux protéines, pourraient expliquer, en partie, les différences d'aspect de ces mitochondries.

Chapitre 3 : Les NDPK-A et NDPK-B, deux autres NDPK du groupe I sont retrouvées associées aux membranes : comparaison structurale

Les NDPK-A et NDPK-B sont deux autres isoformes du groupe I qui sont hautement identiques entre elles (88% d'identité), mais également à la NDPK-D (plus de 50% d'identité). Pourtant elles présentent des points isoélectriques, des partenaires d'interactions et des localisations subcellulaires différentes.

Plusieurs études montrent la capacité de ces trois isoformes à s'associer aux membranes biologiques. Alors que la NDPK-D est capable de se fixer à la membrane interne de la mitochondrie, les NDPK-A et NDPK-B ont été retrouvées associées avec un certain nombre de membranes biologiques comme la membrane plasmique ou le réticulum endoplasmique.

Nous avons étudié la fixation des NDPK-A, NDPK-B et NDPK-D sur des vésicules biomimétiques et nous avons montré qu'elles présentaient des comportements différents en présence de liposomes.

Quelle que soit la composition des liposomes, zwitterionique ou anionique, la NDPK-A n'a jamais été retrouvée associée aux phospholipides dans nos conditions. En présence de 150 mM NaCl, aucune des deux NDPK (A et B) n'est retrouvée associée aux membranes

Ces résultats semblent indiquer qu' *in vivo*, la fixation de la NDPK-A à la membrane pourrait être envisagée via un partenaire protéique ou un autre partenaire lipidique. Un des partenaires possible pourrait être Arf6-GTP, une protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire (Palacios *et al.*, 2002). En outre, comme les NDPK-A et -B sont co-localisées dans le cytoplasme (Pinon *et al.*, 1999) et sont capables de former des hétéro-oligomères (Gilles *et al.*, 1991), une autre hypothèse serait la formation d'hétéro-oligomères NDPK-A/NDPK-B, qui permettrait la fixation "directe" de la protéine aux membranes via la/les sous-unités NDPK-B

La NDPK-D interagit avec les deux types de compositions lipidiques et l'augmentation de la force ionique n'annule pas ces interactions.

La NDPK-B est capable de se lier à des vésicules chargées négativement mais pas les liposomes globalement neutres. La NDPK-D interagit avec les deux types de compositions lipidiques et l'augmentation de la force ionique n'annule pas ces interactions. Par contre, en

présence de 150 mM NaCl, les NDPK-A et NDPK-B ne sont pas retrouvées associées aux membranes.

La fixation de la NDPK-D aux membranes présente une composante hydrophobe plus importante que celle de la NDPK-B. En effet, 150 mM NaCl suffisent à interdire l'interaction NDPK-B-membrane et désorbe complètement la protéine préalablement liée aux lipides. Cette force ionique diminue seulement la quantité de NDPK-D fixée. L'une des raisons possibles à cette différences de fixation est le résidu Arg90 qui n'est présent que dans le site de fixation de la NDPK-D et qui pourrait permettre une adsorption plus forte de cette isoforme et ce même en présence de 150 mM NaCl. Ce résidu Arg90 est remplacé par un acide aspartique dans les deux autres isoformes (A et B), ce qui pourrait diminuer d'autant plus leur interaction.

Pour aller plus loin dans la caractérisation de ces trois NDPKs et pour tenter d'expliquer de telles différences de comportement envers les membranes modèles, nous avons étudié les caractéristiques structurales et d'hydrophobicité de surface de ces isoformes.

Grâce à la spectroscopie infrarouge, nous avons vérifié que les structures secondaires des trois isoformes sont très similaires, ce qui est en accord avec les structures cristallographiques.

Nous avons alors mesuré les spectres de fluorescence à 280 nm des NDPKs (à des absorbances à 280 nm identiques). Alors que les spectres de NDPK-B et NDPK-D sont très similaires (maximum vers 340 nm et intensité de 400 u.a), celui de la NDPK-A est très différent puisqu'il présente un maximum d'émission à 334 nm avec une intensité de 1600 u.a.

L'activité surfacique à l'interface air/eau des trois isoformes a également été mesurée à l'aide d'une cuve de Langmuir. Alors que la NDPK-A est incapable de remonter à l'interface, les deux autres isoformes sont capables de former une monocouche de Gibbs. Comme l'activité surfacique d'une protéine est souvent reliée à la présence de zones hydrophobes accessibles au solvant, nous avons réalisé une titration des NDPKs par une sonde fluorescente, l'ANS, qui se fixe préférentiellement sur les zones hydrophobes. Les résultats montrent une fixation de plus grandes quantités de sonde sur la NDPK-B que sur les NDPK-A et NDPK-D, et confirment les informations obtenues précédemment. En ce qui concerne la NDPK-D, il apparaît que la fluorescence de l'ANS est plus grande pour des faibles concentrations en ANS par rapport aux NDPK-A et NDPK-B. Ceci a été interprété comme une plus grande affinité de l'ANS pour la NDPK-D. Ces différences d'hydrophobicité peuvent être à l'origine des comportements différents des trois isoformes vis-à-vis des phospholipides.

Titre : Structural comparison of highly identical nucleoside diphosphate kinases

Auteurs : Francois-Moutal L., Marcillat O., Granjon T.

Article qui sera soumis à publication prochainement

Résumé :

Les isoenzymes de nucléoside diphosphate kinases (NDPK) sont connues depuis maintenant presque 60 ans et n'ont été considérées que pour leur activité catalytique de transfert de phosphate. La découverte du gène *nme*, un gène antimétastatique codant une NDPK, a renouvelé l'intérêt scientifique pour cette famille d'enzymes. Il est désormais connu que la multiplication des gènes durant l'évolution a été accompagnée de diversifications structurales et fonctionnelles.

Parmi ces isoformes, les NDPK-A, NDPK-B et NDPK-D ont été retrouvées associées à des membranes cellulaires où elles pourraient jouer différents rôles. Dans le but de caractériser plus finement les isoenzymes de NDPK, nous avons étudié la fixation de la NDPK-A, -B et -D à des membranes modèles et nous avons trouvé des différences de comportement envers les différentes compositions en phospholipides. En effet, la NDPK-A n'est pas capable d'interagir avec des membranes dont la composition en phospholipides mime celle du feuillet interne de la membrane plasmique. Sa fixation *in vivo* se ferait alors via un autre partenaire. Les NDPK-B et NDPK-D se fixent directement respectivement à des liposomes mimant le feuillet interne de la membrane plasmique et la membrane interne de la mitochondrie.

Nous avons alors comparé les structures secondaires et tertiaires ainsi que les surfaces hydrophobes des trois isoformes. Les résultats indiquent qu'il existe des différences entre ces protéines, qui pourraient contribuer à expliquer leur comportement distinct envers les phospholipides.

Structural comparison of highly identical nucleoside diphosphate kinases

Francois-Moutal L.¹, Marcillat O.¹, Granjon T.¹

¹Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, CNRS UMR 5246 ICBMS, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.

Correspondence to: Dr Thierry Granjon, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, CNRS UMR 5246 ICBMS, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.

E-mail: thierry.granjon@univ-lyon1.fr

Abstract

Nucleoside diphosphate kinase isoenzymes (NDPK) have been known for nearly 60 years and, until recently, have been considered as housekeeping enzymes. The discovery of a nme gene, an antimetastatic gene that codes for a NDPK, revived the interest for this family. It is now known that the multiplication of nme genes throughout evolution has been accompanied with structural and functional diversification.

Among these isoforms, NDPK-A, NDPK-B and NDPK-D are retrieved associated to cellular membranes where they are thought to play several roles. In order to try to go further in the characterization of NDPK isoenzymes, we studied the binding of NDPK-A, -B and -D to model membranes and found differences in their behavior towards different compositions of phospholipids. Indeed, NDPK-A was not able to bind to inner leaflet plasma membrane mimicking systems whereas NDPK-B and NDPK-D bound with different characteristics respectively to plasma and mitochondrial inner membrane-mimicking liposomes. Then, we compared their tertiary and secondary structures and accessible hydrophobic areas, and found out differences that may contribute to explain their distinct behaviour toward lipids.

Key words: NDPK, nme, fluorescence, infrared, structure, REES, Langmuir.

Introduction

NDPKs catalyse the reversible transfer of the terminal phosphoryl group from a triphosphonucleoside to a diphosphonucleoside (Lascuet Gonin, 2000). Those enzymes are conserved throughout evolution and their presence, in nearly each living organism, from bacteria to mammals, suggests their importance in normal cellular physiology.

NDPK activity has been known since 1953 (Berget Joklik, 1953), and it was thought that the role of NDPK isoenzymes was simply to maintain nucleosides triphosphate concentrations in the different cellular compartments. However, the discovery in the 90's of the nme gene, a

gene with antimetastatic properties, which encodes a NDPK, led to reevaluation of their role in cell physiology (Steege *et al.*, 1988; Wallet *et al.*, 1990). It has also to be noted that, despite high levels of similarity, some NDPK orthologs have lost the NDPK catalytic activity (Munier *et al.*, 1998) and/or have developed other functions (Postel *et al.*, 1993).

In humans, there are ten nme genes divided into two groups. Group I (NDPK-A to NDPK-D) is highly homologous, with sequences identities ranging from 58% to 88%, whereas isoforms of group II are more divergent (25 to 45 % identity) (Lacombe *et al.*, 2000).

All group I proteins exhibit NDPK catalytic activity and all known structures share the same homohexameric quaternary arrangement. Despite this high degree of similarity between these proteins there are obvious differences such as isoelectric points (5.83 to 10.3), tissular and cellular localisation (cytosol, mitochondria, nucleus), interaction partners...

Several studies showed the ability of some of the NDPK isoenzymes to associate with biological membranes ((Baughman *et al.*, 2008; Lacombe *et al.*, 2009; Mitchell *et al.*, 2009)). Although the role of NDPK-membrane association and molecular details of the binding process are still largely unknown, it has been reported that membrane-bound NDPK-A and NDPK-B influence several membrane-linked cellular processes such as endocytosis (Palacios *et al.*, 2002), cellular adhesion (Fournier *et al.*, 2003), ion transport (Srivastava *et al.*, 2006)... NDPK-D, the only mitochondrial isoform of NDPK group I, is able to bind the outer face of mitochondrial inner membrane via its interaction with cardiolipin (CL) (Lacombe *et al.*, 2009) where it is thought to influence CL lateral organization (Francois-Moutal *et al.*, 2013).

We performed a comparative study of molecular properties linked with membrane binding for three group I NDPK isozymes, namely NDPK-A, -B and -D and we found differences in their behavior towards different compositions of phospholipids. Indeed, NDPK-A was not able to bind to inner leaflet plasma membrane mimicking systems suggesting a non lipidic partner *in vivo*. NDPK-B and NDPK-D bound respectively to plasma and mitochondrial inner membrane-mimicking liposomes, but with different binding modes.

Despite highly homologous sequences and close secondary structures assessed by infrared spectroscopy, the three isoforms presented distinct tryptophan fluorescence characteristics. As surface activity properties and accessible hydrophobic areas may contribute to the interaction of proteins with membranes, we used Langmuir and ANS fluorescence that showed further differences between NDPKs and could explain the difference of behaviour towards model membranes.

Materials and method

Materials

Phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS) and phosphatidylinositol (PI) were from Lipid Products. Cholesterol, cardiolipin (CL) from bovine heart, phosphatidylglycerol (PG), lactate dehydrogenase and pyruvate kinase were from Sigma.

Bacterial expression and purification of human NDPKs

Wild – type NDPK A and NDPK-B were expressed in *E.coli* from a pET 21b vector generously provided by Dr Marie-Lise Lacombe (INSERM 402, Paris, France).

Seven hours after induction of NDPK-A expression, cells were pelleted by centrifugation. Cell pellets were resuspended in a 1 mM EDTA 50 mM Tris-acetate pH 8 buffer., sonicated and centrifuged at 20 400 g for 30 min at 4°C to eliminate cell debris.. The supernatant was loaded on a 15Q column. NDPK-A was eluted with a 1 mM EDTA, 50 mM Tris-acetate pH 6.5 buffer.

For NDPK-B purification, cells were resuspended in 50 mM Tris/HCl, pH 8.4, 1 mM EDTA, 1mM DTT, sonicated and centrifuged at 20 400 g for 30 min at 4°C. The supernatant was fractionated in 60-90 % saturated ammonium sulfate (Burgess, 2009). The 90 % saturated pellet was resuspended in 50 mM Tris/HCl, pH 8.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, dialysed against the same buffer and loaded on a DEAE-Trisacryl column. NDPK-B was eluted with 10 mM MgCl₂.

Both purified NDPK-A and NDPK-B were desalted using a PD10 column equilibrated with a 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer

N-term His-tagged NDPK-D was expressed in *E.coli*, using a pET 28a(+) vector. Recombinant NDPK-D was purified using a modification of an earlier protocol (Milon *et al.*, 2000). Briefly, cells were resuspended in 20 mM NaH₂PO₄, pH 7.4, sonicated and centrifuged at 20 400 g for 30 min at 4°C. The supernatant was loaded on a Ni-NTA column (Qiagen). NDPK-D was eluted with an imidazole gradient and dialysed against 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mM EDTA.

Protein concentrations were determined by the Lowry method as modified by Bensadoun Weinstein using bovine serum albumin as a standard. The purity of proteins was checked with SDS-PAGE.

Assay of NDPK activity

NDPK activity was measured using a coupled lactate deshydrogenase/pyruvate kinase assay (Agarwal *et al.*, 1978). The assays were carried out at 25°C in a 1 mL reaction mixture containing 75 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 0.1 mM NADH, 1mM phosphoenolpyruvate, 1 mM TDP and 5 U of both pyruvate kinase and lactate deshydrogenase in a 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 buffer.

Infrared Spectra

Proteins were lyophilized and solubilized in 20 mM Tris-HCl prepared in deuterium oxide (p²H 7.4) buffer so that their final concentration was of 5 g.L⁻¹. The p²H was measured with a glass electrode and was corrected by a value of 0.4 according to (Glasoeet Long, 1960).

Samples were loaded between two BaF₂ circular cells, with a 56 µm Teflon spacer. Fourier Transformed Infrared (FTIR) spectra were recorded with a Nicolet iS10 FTIR spectrometer which was continuously purged with dry air; 256 scans were collected, co-added and Fourier-transformed for each sample. Every FTIR spectrum was representative of at least three independent measurements. The infrared spectra of buffer and residual water vapour were subtracted from the infrared spectrum of the sample. Band positions were determined using second derivative spectra.

Tryptophan fluorescence

Measurements were carried out using 0.6 µM of NDPK in 200 µL of 20 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer and were performed using a Hitachi F4500 fluorometer (150-W Xe). Excitation and emission band-pass were set at 2.5 and 5 nm, respectively. Emission intensity was measured between 320 and 400 nm with excitation at 280 nm, using a 1-cm path length thermostated quartz cuvette. Each measure was repeated at least three times and all fluorescence spectra were corrected for the baseline spectra of the buffer solution to remove the contribution of Raman scattering band.

Monomolecular film formation at the air buffer interface and surface pressure measurements

All experiments were performed at constant temperature (21°C) and under continuous stirring using a film balance (Nima, UK) equipped with a Wilhelmy type surface-pressure measuring system. Various concentration of protein, ranging from 2 to 16 nM, were injected in a rectangular through with a constant area of 84 cm². The through, which was maintained within a closed box to avoid dust deposition and to limit water evaporation, was filled with 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0,1mM EDTA subphase buffer. Pressure was recorded as a function of time.

ANS accessibility to protein hydrophobic patches

Measurements were performed with 0.6 μ M NDPK in 600 μ L of a 0.1 mM EDTA 20mM Tris pH7.4 buffer containing 20 μ M ANS added from a 10 mM stock solution in ethanol. Measurements were performed at 20°C with a Hitachi F4500 fluorometer using an excitation wavelength of 395nm and the emission spectrum was recorded from 400 to 550nm. The λ_{max} of the protein-ANS complex was around 470nm. The excitation and emission slits were set at 2.5 and 10nm respectively. All fluorescence spectra were corrected for spectra of the buffer solution containing only ANS. The apparent hydrophobicity of each sample was expressed as the area of the emission fluorescence spectrum in the abovementioned range.

Preparation of liposomes

Liposomes were prepared by hydration and extrusion (Mayer *et al.*, 1986). Chloroform solutions of the required lipids were mixed to reach the desired molar ratio, i.e: PC-PE-CL (2:1:1), PC (100%), PC (12%)- PE (35%)- PS (22%)- PI (9%)- cholesterol (22%). Dried lipids were then hydrated (20 mg/mL) in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mM EDTA buffer and dispersed to produce MLV. The lipid suspension was then subjected to 6 freeze/thaw cycles and finally extruded 19 times through polycarbonate membranes (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) with 0.4 and 0.2 μ m-diameter pores using a mini-extruder (MacDonald *et al.*, 1991). During liposome preparation, lipids were kept at temperatures higher than their gel to liquid crystal transition temperature.

Interaction of proteins with liposomes

0,5 μ M NDPK was incubated at 25 °C during 20 min with 1 mM of liposomes. The mixture was then centrifuged at 160 000 g during 1 hour with a Beckman airfuge. The supernatant was separated from the pellet and the latter was resuspended in 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM EDTA solution. The percentage of binding was determined by using Eq (1)

$$\% \text{binding} = [\text{activity in pellet} / (\text{pellet activity} + \text{supernatant activity})] \times 100 \quad (1)$$

Results and discussion

1. Structure and resemblance NDPKs

Fig 1 shows the alignment of NDPK-A, -B and -D. Group I NDPKs are highly identical proteins as they present more than 50% identity. The closest homologs are NDPK-A and NDPK-B which share 88 % of identity.

By the use of chimera and Swiss PDB viewer software, we imaged the electrostatic and hydrophobic properties of symmetrical surfaces known to be involved in phospholipid

interaction as it presents the membrane binding sites (namely Lys56-Arg58 in NDPK-B and Arg89-Arg90-Lys91 in NDPK-D (amino acids numbering in NDPK-D is shifted due to the 33 residues long N-terminal mitochondrial targeting sequence that is removed upon importation into mitochondria))(figure 2). NDPK-A mainly exposes negatively charged residues (in red), whereas NDPK-B surface is positively charged (in blue). NDPK-D exhibits less charged residues and we see a central region (in the black circle) with no net charges. It is noteworthy that this region is absent from NDPK-A and NDPK-B.

NDPK-A	MANC E RT F I A IKPDGVQRGLVGE I IKR F E Q K G FRLVGLKFMQ S E D LL K E H YVDL K DRPF 60
NDPK-B	MANL E RT F I A IKPDGVQRGLVGE I IKR F E Q K G FRLVAMKFLRA S E H L K QHYIDL K DRPF 60
NDPK-D	SWTR E RTL V A V KPDGVQRGLVGD V I Q R F ERR G FTLVGM K MLQ A PE S VL A E H YQDL R RRPF 60
NDPK-A	FAGLVK Y M H SGPVVAMVW E GLNVVKTGRV M L G ETNP A DSK P GTIR G DFC I QVGRN I I H GS 120
NDPK-B	FPGLVK Y M N SGPVVAMVW E GLNVVKTGRV M L G ETNP A DSK P GTIR G DFC I QVGRN I I H GS 120
NDPK-D	YPALIR Y M S SGPVVAMVW E GYNVVRAS R AN I G H TDS A E A APGTIR G DFSV H IS R N V I H AS 120
NDPK-A	DS V ES A E K E I GL W F H PEELVD Y TS-CAQ N W I YE- 152
NDPK-B	DS V K S A E E K E I SL W F K PEELVD Y KS-CA H D W YE- 152
NDPK-D	DS V E G A Q R E I Q L W F Q SEELV S WADGG G H S I H PA 154

Figure 1 : Multi-alignemnt of NDPK-A, NDPK-B and NDPK-D primary sequences using ClustalW. Residues in red are conserved among the three isoforms.

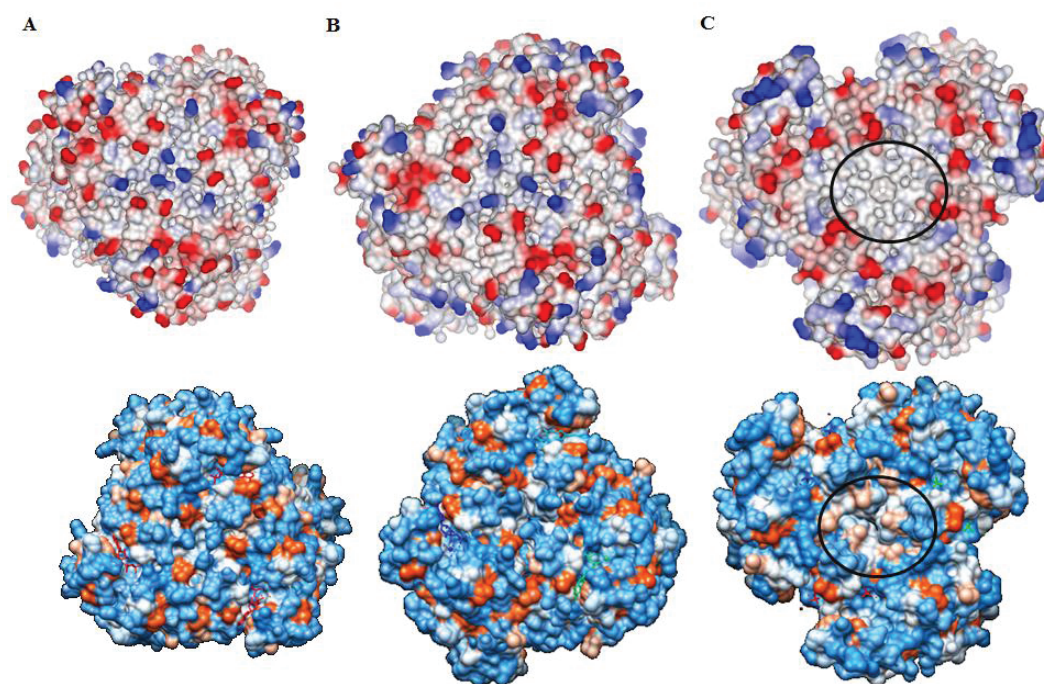


Figure 2 : Upper panel :Modelisation of electrical surface of NDPK-A (A), NDPK-B (B) or NDPK-D (C), using Swiss-PDB Viewer. Colour code: red is positive charges, blue is negative charges. Modelisation of hydrophobic surface of NDPK-A (A), NDPK-B (B) or NDPK-D (C), using Chimera. Colour code: red is positive charges, blue is negative charges. PDB code for NDPK-A : 2hvd, NDPK-B : 1nue, NDPK-D : 1ehw.

When taking a closer look to NDPK hydrophobic surfaces, we can see that NDPK-B exhibits more hydrophobic regions than the other two.

2. *Binding of protein to model vesicles*

Biological membrane association allow proteins such as NDPKs to achieve cellular functions. Indeed, at the plasma membrane level, NDPK-A and NDPK-B influence adhesion (Fournier *et al.*, 2003), ion transport (Srivastava *et al.*, 2006), etc... Whereas in mitochondria, NDPK-D is thought to play a role in structuring mitochondria inner membrane, apoptosis (Fournier *et al.*, 2003; Lacombe *et al.*, 2009)...

The ability of NDPK-A and B to bind directly to membrane vesicles was monitored using large unilamellar vesicles (LUV) made of a mixture of PC-PE-PS-PI-ch (12-35-21-9-22 molar ratio) to mimic plasma membrane inner leaflet (Stahelin *et al.*, 2003). NDPK-D binding was tested on liposomes made of PC-PE-CL (2:1:1) which mimics the inner membrane of mitochondria (Comte *et al.*, 1976). We also tested the ability of all 3 isoenzymes to bind to zwitterionic PC liposomes.

In our conditions, NDPK-A has never been found associated to neither zwitterionic nor negatively charged membranes. NDPK-B was able to bind directly to negatively charged vesicles (85% of binding) but not to liposomes containing only zwitterionic PC (4%). NDPK-D was able to bind both compositions (35% to PC and 75% to PC-PE-CL liposomes).

In order to obtain further information on the nature of the interactions, the same experiment was repeated in presence of 150 mM NaCl. In these conditions, neither NDPK-B nor NDPK-A were able to bind to liposomes, but NDPK-D was still able to interact with both zwitterionic (25%) and anionic (54%) liposomes.

Those results indicate that membrane binding mechanisms of these enzymes are therefore different. NDPK-B interaction with membranes is driven by electrostatic interaction, as indicated by the interaction with negatively charged phospholipids and by the drastic effect of high ionic force. Its closest homolog, NDPK-A, does not bind to liposomes. Nevertheless, NDPK-A has been shown to be associated to plasma membrane and to membranes of different organelles such as endoplasmic reticulum (reviewed in (Bosnar *et al.*, 2009)). This observation suggests that for this isoenzyme, membrane association is mediated by a partner with a non-phospholipidic character. Palacios *et al.* proposed that this partner could either be an intrinsic membrane protein or a membrane-associated protein like Arf6-GTP, a protein involved in adherens junction disassembly (Palacios *et al.*, 2002). ARF6 has a variety of

cellular functions that are frequently involved in trafficking of biological membranes and transmembrane protein cargo. ARF6 has specifically been implicated in endocytosis of plasma membrane proteins and also, to a lesser extent, plasma membrane protein recycling.

Although both NDPK-D and NDPK-B are able to bind to membranes, our results highlight two main differences in their binding mechanisms: NDPK-B can bind to membrane only if they contain negatively charged phospholipids, whereas NDPK-D binds to neutral membranes as well as to negatively charged ones. In line with these results is the fact that NDPK-D binds to membranes even in a high ionic strength buffer, whereas NDPK-B does not.

Site-directed mutagenesis has been used to identify amino acids that play an important role in NDPK-B and NDPK-D binding to membranes (Baughman *et al.*, 2008; Tokarska-Schlattner *et al.*, 2008). They showed that, as expected from the sequence similarity between these proteins, the binding sites involves equivalent residues, namely Lys56-Arg58 in NDPK-B and Arg89-Arg90-Lys91 in NDPK-D (amino acids numbering in NDPK-D is shifted due to the 33 residues long N-terminal mitochondrial targeting sequence that is removed upon importation into mitochondria).

This Arg90 appears to be a distinctive feature of NDPK-D (figure 1) and was frequently encountered in protein binding to surface of membrane containing anionic phospholipids (Schmidt *et al.*, 2010a). This additional positively charged residue in the binding site is very likely to allow a tighter interaction as solvent access to the binding interface would be reduced and thus could explain why increasing ionic strength is not able to remove NDPK-D from the lipidic membranes. Moreover, the fact that NDPK-D binding occurs even in a high ionic strength buffer strongly suggests that binding mechanism also involves a non-ionic component. When studying the primary sequence of NDPK-D, the Tyr residue, in the vicinity of the binding site and retrieved only in this isoform, is a good candidate for explaining the protein binding to zwitterionic liposomes in presence of 150 mM NaCl.

3. Structural comparison of NDPKs

Peripheral proteins are most commonly scaffold proteins containing one or more regions that associate with lipid-head groups, thereby anchoring the entire protein structure near the lipid surface (Choet Stahelin, 2005; DiNitto *et al.*, 2003). Composition and/or structural modifications of these regions may affect drastically protein binding to membranes.

To explain the differences observed in NDPKs binding to membrane, we compared the secondary and tertiary structures of NDPKs using infrared spectroscopy and fluorescence measurements.

3.1 Secondary structures characterization using infrared spectroscopy

The absorption of infrared radiation by proteins leads to characteristic vibrational bands. Among those bands, the amide I arises from the vibration of the amide bonds that link the amino acids (Barth, 2007; Berthomieu et Hienewadel, 2009). Therefore, FTIR spectroscopy provides information about the secondary structure content of proteins.

The three NDPKs infrared spectra (figure 3) exhibit a main amide I band with a maximum around 1660-1650 cm^{-1} , characteristic of proteins with a high proportion of α -helix structures. Analysis of the second derivative spectrum indicated that the amide I region is made of several components, two of which are α helix vibration bands, with maxima at around 1654 cm^{-1} and 1665 cm^{-1} . Those bands are indicative of the coexistence of two types of α helical structure. As the position of vibrational bands depends on hydrogen bonding, the band located at the higher wavenumber is likely to correspond to more flexible and more dynamic α helices than the 1654 cm^{-1} one (Cladera *et al.*, 1992; Granjon *et al.*).

Another major band was located in the 1640-1650 cm^{-1} region and can be attributed to random structures (Barth, 2007). Several peaks/contributions can also be seen in the 1630-1612 cm^{-1} and 1670 and 1690 cm^{-1} region. These band splitting and band position are characteristic of different types of beta sheet structures (Barth, 2007; Surewicz *et al.*, 1993).

NDPK-A and NDPK-B infrared spectra are quite similar, both in band position and in proportions of alpha helices versus beta sheets (1,29 and 1,38 respectively for NDPK-A and NDPK-B), while NDPK-D spectrum presented minute modification mainly due to a higher alpha helix versus beta sheet ratio (1,57).

1.2 NDPK tertiary structure characterization using tryptophan fluorescence properties

In order to get more insight into the structural characterization and hypothetical differences between the three isoforms and to evidence modifications that could not be evidenced into FTIR spectra, we performed fluorescence measurements.

Tryptophan fluorescence is one of the most widely used tools to probe tertiary structure of proteins. In literature, intensity, quantum yield, and wavelength of maximum fluorescence emission of tryptophan residues are always described as very solvent dependent (Calliset Liu, 2004). Therefore, embedded or surface exposed tryptophans show different fluorescence characteristics. Consequently, we compared the tryptophan fluorescence emission spectra of the three NDPK isoforms using a 280 nm excitation wavelength, as described in Material and Methods.

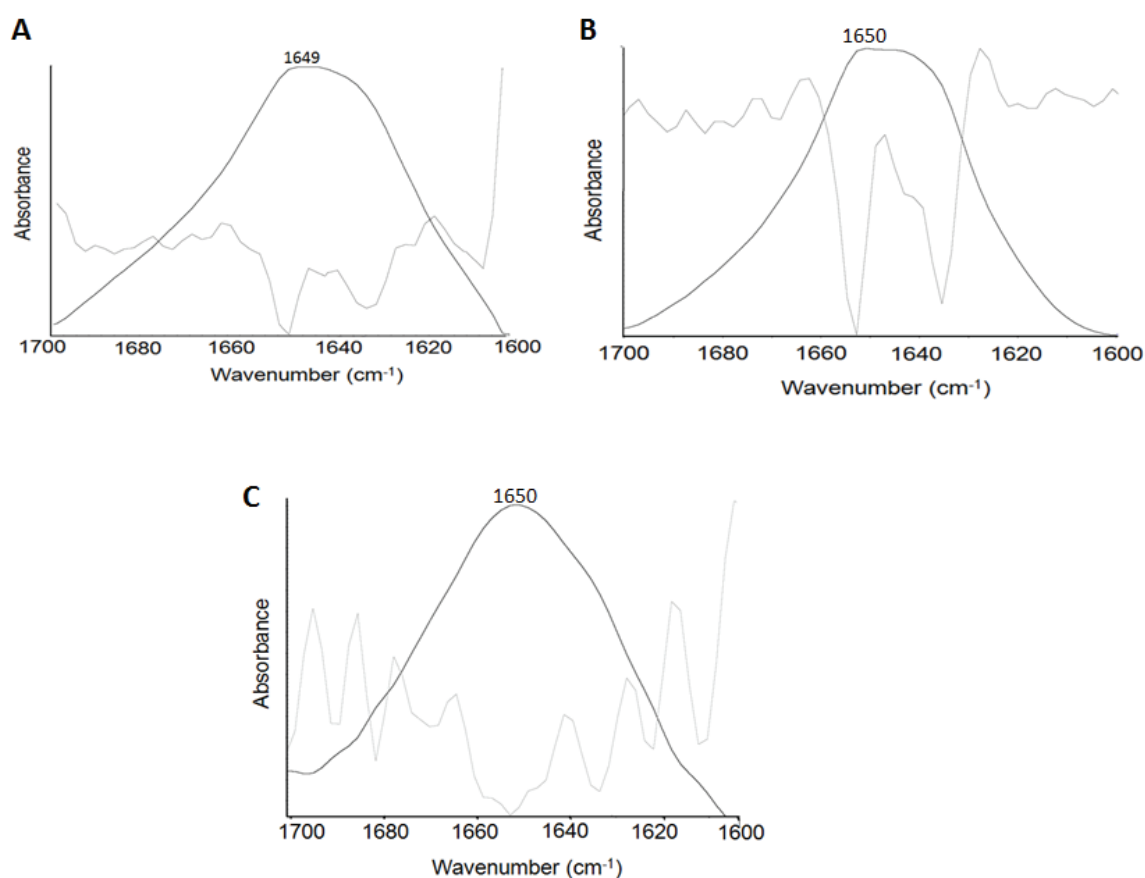


Figure 3 : Infrared spectra in black, in the region of the amide I band, of (A) NDPK-A, (B) NDPK-B and (C) NDPK-D. In grey is the second derivate.

All three NDPKs sequences present three tryptophane residues (fig 1). Two of them are in the same position in each sequence (position 78 and 133). The third one is in position 149 in NPK-A and NDPK-B but at position 142 in NDPK-D. One as to note that the NDPK-D used in this article presented the mutation W35G, the tryptophan residue in position 35 (2 on the figure 1) no longer exists in the sequence.

As shown in figure 4, NDPK-A exhibited a maximum wavelength of 334 nm with a fluorescence intensity of about 1 600 (arbitrary units) and both NDPK-B and NDPK-D

showed an emission maximum of about 339-340 nm with an intensity of 400 (measured with exactly the same absorbance at 284 nm).

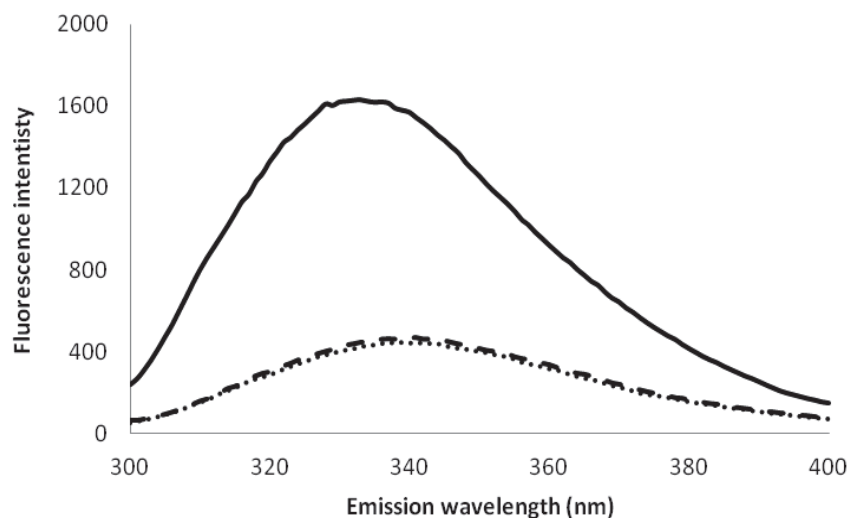


Figure 4 : Fluorescence spectra of NDPK-A (—), NDPK-B (---) and NDPK-D (....).

The fluorescence spectrum shifts to shorter wavelength as the polarity of the solvent surrounding the tryptophane residue decreases. Tryptophan residues buried within the hydrophobic core of proteins display maximum fluorescence emission wavelength shifted by 10 to 20 nm compared to tryptophan residues exposed to protein surface (Calliset Liu, 2004). In the case of NDPK-D, the red shift in the fluorescence emission wavelength, in comparison with NDPK-A, could be attributed to the presence of a rather exposed to solvent molecules tryptophan residue, Trp142. Interestingly, this Trp 142 residue is retrieved only in NDPK-D sequence.

The fact that NDPK-B fluorescence was different from NDPK-A is more surprising, considering their high identity and the same positions of each Trp residues (88%). Moreover, there is no Trp solvent accessible enough to explain such differences with NDPK-A. However, when pinpointing residues localized in the close vicinity (closer than 6 Å) of the three tryptophan residues (Trp78, Trp133 and Trp149) present in the enzyme structure, it resulted that NDPK-B Trp149, the least solvent accessible, presents an Asp residue in its vicinity. This residue is replaced by an Asn in NDPK-A. Tryptophan fluorescence can also be quenched by neighboring protonated acidic groups such as Asp or Glu (Calliset Liu, 2004). The presence of this residue in the NDPK-A could thus explain the blue shift of its tryptophan fluorescence emission spectrum.

Thus, from those spectroscopic results, we can conclude that despite close secondary structures, subtle differences in the three isoforms tertiary structures exist.

2. Accessibility of hydrophobic areas

We further investigate surface activity properties and accessibility of hydrophobic areas of three NDPKs, as these properties may contribute to the interaction of proteins with membranes.

2.1. Air-water interface adsorption Kinetics

We first studied exposed hydrophobic areas of these NDPK isoforms. To this purpose, layes at the air/buffer interface provided us a simple way to monitor interfacial properties of NDPKs under controlled conditions. Indeed, due to their amphiphilic nature, proteins are well known to exhibit variable propensities to form viscoelastic film once adsorbed at the air/water interface (Maget-Dana *et al.*, 1999; Vernoux *et al.*, 2006).

The increase in surface pressure at constant area was recorded as a function of time after NDPKs's injection at various protein concentrations into the subphase. Whatever its concentration (between 2 and 16 nM), NDPK-A never induced any increase of the surface pressure and is devoided of surface activity. On the contrary, when injected at concentrations above 2 nM, NDPK-B induced an increase in the surface pressure at a rate increasing with protein concentration (4 to 16 nM). (fig. 5B).

A maximum surface pressure increase of 10-12 mN/m was reached when NDPK-B was injected at 8 nM (Fig 5A). This maximum surface pressure remained fairly constant, indicating a stable monolayer was formed at the interface. The same increase in surface pressure was observed with 8 nM of NDPK-D injected in the subphase, although this value is reached at a slower rate.

On the basis of the cross section of the NDPK hexamer (about 4 000 Å²), and if we suppose that all protein molecules are adsorbed at the interface, the area occupied by 8 nM enzyme added in the Langmuir cuve is around 86 cm², which is approximately the cuve area. This suggests that in these conditions all the enzyme is adsorbed at the interface in a native or near-native state and corroborates the fact that hexameric enzyme is present at the interface. Despite similar sequence, NDPK-A shows no affinity for the air-buffer interface than its homologous NDPK-B. Furthermore, a lag phase was observed both for NDPK-B and -D, during which the surface pressure did not increase. This phase corresponds to the time required for molecules to attain a minimum surface coverage.

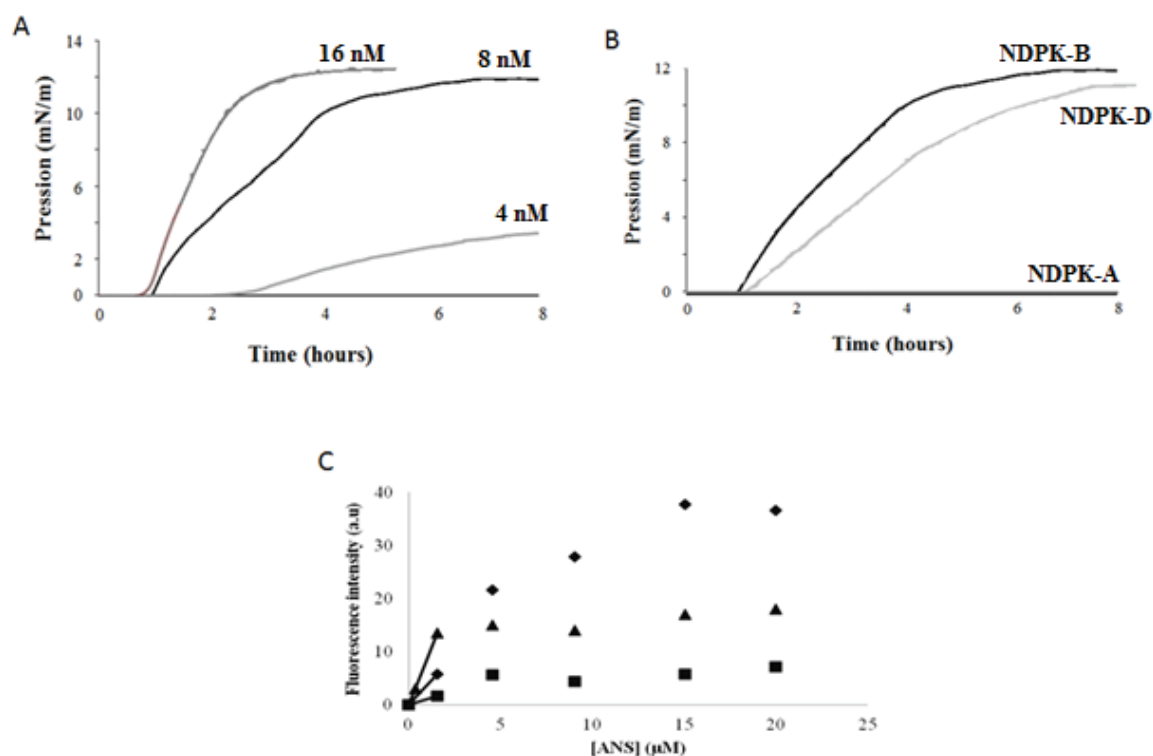


Figure 5 : A. Kinetics of surface pressure increase after injection of 4 nM (light grey), 8 nM (black) or 16 nM (dark grey) of NDPK-B in 20 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4. B. Kinetics of surface pressure increase after injection of 8 nM of either NDPK-A, NDPK-B or NDPK-D in 20 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4. Temperature: 21°C. C. Variation of the area of the fluorescence emission peak of ANS as a function of the concentration of added ANS. 0.6 μM of either NDPK-B (losanges), NDPK-D (triangles) and NDPK-A (squares) were incubated with ANS in 20 mM Tris, 0.1 mM EDTA pH 7.4; temperature : 21°C.

As shown by many studies, one of the driving forces for protein adsorption at interfaces is dehydration of hydrophobic areas of the protein surface and of the hydrophobic air/water interface (Angeletti *et al.*, 2004; Maget-Dana *et al.*, 1999; Vernoux *et al.*, 2006), our results thus suggest differences in exposed hydrophobic areas at the surface of NDPK isoforms.

2.2. Estimation of protein hydrophobicity

We used ANS fluorescence intensity as a probe of hydrophobic surfaces exposed on NDPK-A, -B and -D surface. Indeed, ANS fluorescence yield is strongly enhanced when bonded to hydrophobic sites.

We measured ANS fluorescence intensity for increasing concentrations of this probe added to a fixed concentration of each of the 3 NDPK isoenzymes (Figure 5C). For each one, fluorescence intensities can be fitted to a hyperbolic model. Maximum fluorescence intensity

is proportional to the total amount of bound ANS, while the dissociation constant provides information on the average affinity of the proteins for ANS. With NDPK-A, fluorescence intensity is quite low, lower than for the other NDPKs. With NDPK-B, fluorescence intensity is much higher suggesting that there are more bonded ANS molecules although affinity is in the same range (3.5 μM for NDPK-A and 7.8 μM for NDPK-B). For NDPK-D, maximal fluorescence intensity is approximately half of that measured with NDPK-B but the shape of the curve suggests higher affinity.

CONCLUSION

Several studies has shown the ability of the highly identical NDPK-A, NDPK-B and NDPK-D isoenzymes to associate with biological membranes ((Baughman *et al.*, 2008; Milon *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2009)) where they could play a role in cellular processes such as endocytosis, apoptosis...

In this study, we first compared the binding process of these three NDPK to model membranes. NDPK-A was unable to bind directly to model membranes, thus a proteic partner seems to be implicated in the association process. NDPK-B interaction with membranes is driven by electrostatic interaction, as indicated by the interaction with negatively charged phospholipids and by the drastic effect of high ionic force. NDPK-D in the other hand, was able to bind membranes in all conditions used (with or without 150 mM NaCl, and whatever the phospholipid composition of the membrane, anionic or zwitterionic).

We then analyzed structure and hydrophobic surface characteristics, linked with membrane binding of NDPKs.

Despite close secondary structures as assessed by FTIR, tryptophane fluorescence exhibited a major difference between NDPK-A and the two other proteins. Moreover, NDPK-B and NDPK-D are able to form Gibbs monolayer at the air-buffer interface but NDPK-A is unable to do so. The ANS fluorescence confirmed these results and brought to light the greater affinity of NDPK-D for ANS. Altogether, the present results are quite surprising. Indeed, they indicate that NDPK-A, -B, and -D present quite different behavior regarding surface activity and accessibility of hydrophobic areas, although the three isoforms share a high degree of sequence similarity and secondary structure.

To conclude, the 3 NDPK isoforms, despite strong homologies and subtle different structural characteristics, exhibit diverse hydrophobic surfaces, which may in turn explain divergent behavior in terms of membrane interaction.

References:

- Agarwal, R. P., B. Robison et R. E. Parks, Jr. (1978). Nucleoside diphosphokinase from human erythrocytes. *Methods Enzymol* 51: 376-386.
- Angeletti, S., B. Maggio et S. Genti-Raimondi (2004). Surface activity and interaction of StarD7 with phospholipid monolayers. *Biochim Biophys Res Commun* 314: 181-185.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1767: 1073-1101.
- Baughman, C., J. Morin-Leisk et T. Lee (2008). Nucleoside diphosphate kinase B (NDKB) scaffolds endoplasmic reticulum membranes in vitro. *Exp Cell Res* 314: 2702-2714.
- Berg, P. et W. K. Joklik (1953). Transphosphorylation between nucleoside polyphosphates. *Nature* 172: 1008-1009.
- Berthomieu, C. et R. Hienerwadel (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynth Res* 101: 157-170.
- Bosnar, M. H., R. Bago et H. Cetkovic (2009). Subcellular localization of Nm23/NDPK A and B isoforms: a reflection of their biological function? *Mol Cell Biochem* 329: 63-71.
- Burgess, R. R. (2009). Protein precipitation techniques. *Methods Enzymol* 463: 331-342.
- Callis, P. R. et T. Liu (2004). Quantitative Prediction of Fluorescence Quantum Yields for Tryptophan in Proteins. *J. Phys. Chem. B* 108: 4248-4259.
- Cho, W. et R. V. Stahelin (2005). Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34: 119-151.
- Cladera, J., M. Sabes et E. Padros (1992). Fourier transform infrared analysis of bacteriorhodopsin secondary structure. *Biochemistry* 31: 12363-12368.
- Comte, J., B. Maisterrena et D. C. Gautheron (1976). Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes. *Biochim Biophys Acta* 419: 271-284.
- DiNitto, J. P., T. C. Cronin et D. G. Lambright (2003). Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Sci STKE* 2003: re16.
- Fournier, H. N., C. Albiges-Rizo et M. R. Block (2003). New insights into Nm23 control of cell adhesion and migration. *J Bioenerg Biomembr* 35: 81-87.
- Francois-Moutal, L., O. Maniti, O. Marcillat et T. Granjon (2013). New insights into lipid-Nucleoside Diphosphate Kinase-D interaction mechanism: Protein structural changes and membrane reorganisation. *Biochim Biophys Acta* 1828: 906-915.
- Glasoe, P. K. et F. A. Long (1960). Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *J. Physiol. Chem.* 64: 188-190.
- Granjon, T., O. Maniti, Y. Auchli, P. Dahinden, R. Buchet, O. Marcillat et P. Dimroth Structure-function relations in oxaloacetate decarboxylase complex. Fluorescence and infrared approaches to monitor oxomalonate and Na(+) binding effect. *PLoS One* 5: e10935.
- Lacombe, M. L., L. Milon, A. Munier, J. G. Mehus et D. O. Lambeth (2000). The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr* 32: 247-258.
- Lacombe, M. L., M. Tokarska-Schlattner, R. F. Epand, M. Boissan, R. M. Epand et U. Schlattner (2009). Interaction of NDPK-D with cardiolipin-containing membranes: Structural basis and implications for mitochondrial physiology. *Biochimie* 91: 779-783.
- Lascu, I. et P. Gonin (2000). The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr* 32: 237-246.
- MacDonald, R. C., R. I. MacDonald, B. P. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao et L. R. Hu (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1061: 297-303.
- Maget-Dana, R., D. Lelievre et A. Brack (1999). Surface active properties of amphiphilic sequential isopeptides: Comparison between alpha-helical and beta-sheet conformations. *Biopolymers* 49: 415-423.
- Mayer, L. D., M. J. Hope et P. R. Cullis (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta* 858: 161-168.
- Milon, L., P. Meyer, M. Chiadmi, A. Munier, M. Johansson, A. Karlsson, I. Lascu, J. Capeau, J. Janin et M. L. Lacombe (2000). The human nm23-H4 gene product is a mitochondrial nucleoside diphosphate kinase. *J Biol Chem* 275: 14264-14272.
- Mitchell, K. A., G. Szabo et S. O. A. de (2009). Direct binding of cytosolic NDP kinases to membrane lipids is regulated by nucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1793: 469-476.
- Munier, A., C. Feral, L. Milon, V. P. Pinon, G. Gyapay, J. Capeau, G. Guellaen et M. L. Lacombe (1998). A new human nm23 homologue (nm23-H5) specifically expressed in testis germinal cells. *FEBS Lett* 434: 289-294.

- Palacios, F., J. K. Schweitzer, R. L. Boshans et C. D'Souza-Schorey (2002). ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly. *Nat Cell Biol* 4: 929-936.
- Postel, E. H., S. J. Berberich, S. J. Flint et C. A. Ferrone (1993). Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science* 261: 478-480.
- Schmidt, N., A. Mishra, G. H. Lai et G. C. Wong (2010). Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Lett* 584: 1806-1813.
- Srivastava, S., Z. Li, K. Ko, P. Choudhury, M. Albaqumi, A. K. Johnson, Y. Yan, J. M. Backer, D. Unutmaz, W. A. Coetzee et E. Y. Skolnik (2006). Histidine phosphorylation of the potassium channel KCa3.1 by nucleoside diphosphate kinase B is required for activation of KCa3.1 and CD4 T cells. *Mol Cell* 24: 665-675.
- Stahelin, R. V., J. D. Rafter, S. Das et W. Cho (2003). The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C- α and group IVa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 278: 12452-12460.
- Steeg, P. S., G. Bevilacqua, R. Pozzatti, L. A. Liotta et M. E. Sobel (1988). Altered expression of NM23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus 2 Ela inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res* 48: 6550-6554.
- Surewicz, W. K., H. H. Mantsch et D. Chapman (1993). Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* 32: 389-394.
- Tokarska-Schlattner, M., M. Boissan, A. Munier, C. Borot, C. Mailleau, O. Speer, U. Schlattner et M. L. Lacombe (2008). The nucleoside diphosphate kinase D (NM23-H4) binds the inner mitochondrial membrane with high affinity to cardiolipin and couples nucleotide transfer with respiration. *J Biol Chem* 283: 26198-26207.
- Vernoux, N., T. Granjon, O. Marcillat, F. Besson et C. Vial (2006). Interfacial behavior of cytoplasmic and mitochondrial creatine kinase oligomeric states. *Biopolymers* 81: 270-281.
- Wallet, V., R. Mutzel, H. Troll, O. Barzu, B. Wurster, M. Veron et M. L. Lacombe (1990). Dictyostelium nucleoside diphosphate kinase highly homologous to Nm23 and Awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and Drosophila development. *J Natl Cancer Inst* 82: 1199-1202.

Chapitre 4 : Caractéristiques de l'interaction NDPK-B-phospholipides du feuillet interne de la membrane plasmique

Comme indiqué précédemment, la NDPK-B est une enzyme cytosolique et nucléaire, retrouvée associée à plusieurs membranes biologiques (membrane plasmique, réticulum endoplasmique,...). Récemment, il a été montré que sa capacité à interagir directement avec les phospholipides était liée à la présence à sa surface de deux résidus acides aminés Arg-Lys (par monomère) (Baughman *et al.*, 2008). Le but de ce chapitre, est, de manière analogue à celui traitant la NDPK-D, de déterminer les caractéristiques de l'interaction NDPK-B/membrane et les conséquences structurales de cette interaction sur la protéine et les phospholipides.

4.1.Article NDPK-B

Dans l'article qui suit, nous avons étudié les caractéristiques de la fixation de la NDPK-B sur des membranes mimant le feuillet interne de la membrane plasmique (PC-PE-PS-PI-cholestérol).

La NDPK-B est capable de se fixer sur des liposomes PC-PE-PS-PI-cholestérol. Le pourcentage de fixation a été déterminé en présence de diverses concentrations en NaCl. En absence de sel, ce pourcentage est d'environ 80%. A faible concentration en NaCl (50 mM), le taux de fixation augmente et passe à 85-90%. Avec du NaCl 75 mM, la fixation est diminuée, puis complètement inhibée pour des concentrations supérieures à 100 mM de NaCl. En présence de 150 mM de NaCl, la protéine, préalablement fixée sur les vésicules, est totalement décrochée. L'interaction de la NDPK-B avec les lipides présente une composante hydrophobe, mais celle-ci est insuffisante pour permettre à elle seule la fixation de la protéine. La composante électrostatique de cette interaction est majoritaire.

Nous avons ensuite voulu mettre en évidence les partenaires lipidiques de la NDPK-B. Sur des vésicules de type PC ou PC-cholestérol, aucune fixation n'est observée. La présence d'un phospholipide chargé négativement (PS ou PI) permet une fixation importante de la protéine sur les vésicules. La présence de cholestérol dans des liposomes chargés négativement semble augmenter le taux de fixation de la NDPK-B mais ce, seulement lorsque la membrane contient du PI.

Nous avons ensuite déterminé l'état d'hydratation des membranes suite à la fixation de la NDPK-B grâce à l'utilisation du Laurdan. Les résultats montrent une baisse d'hydratation des membranes PC-PE-PS-PI incubées avec la protéine. Cet effet est plus marqué en présence de 50 mM NaCl, ce qui semble logique puisque la quantité de protéines fixées est plus grande. Les résultats en présence de 150 mM NaCl, ce qui empêche la fixation de la NDPK-B, ne montrent aucun effet de la protéine sur la fluorescence du Laurdan. Lorsque les membranes contiennent du cholestérol, aucune modification des valeurs de GP n'est observée. Cependant, il est possible que l'effet de la protéine soit masqué par celui du cholestérol. En présence de ce lipide, la membrane est dans un état plus rigide qu'en absence ce qui explique les valeurs de GP plus élevée.

Une analyse plus fine par spectroscopie infrarouge dans la région des groupements phosphate (1050 cm^{-1}) indique une baisse de l'état d'hydratation de ces groupements, quelle que soit la composition de la membrane (en présence ou non de cholestérol), ainsi qu'une baisse de la mobilité des chaînes acyles ($2950\text{-}2820\text{ cm}^{-1}$) au sein des membranes, plus modérée lorsque le cholestérol est présent.

Nous nous sommes ensuite intéressés à d'éventuelles modifications de structure de la protéine adsorbée. Bien qu'aucun déplacement de la position du maximum d'émission du spectre de fluorescence de la protéine fixée par rapport à la protéine en solution (lorsque la longueur d'onde d'excitation est de 280 nm) ne soit observé, la NDPK-B adsorbée sur les liposomes contenant ou non du cholestérol présente un fort déplacement de son maximum d'émission de fluorescence (+ 11 nm) lorsqu'elle est excitée dans la zone rouge de son spectre (les plus grandes longueurs d'onde d'excitation de fluorescence). Ce déplacement, Red Edge Excitation Shift (REES), qui n'est que de 5 nm pour l'enzyme soluble indique une restriction de la mobilité de l'environnement de certains tryptophanes de l'enzyme lors de sa fixation sur les phospholipides. Une modification de la structure tertiaire de la NDPK-B suite à sa fixation sur les membranes pourrait expliquer les résultats observés. Cette modification de structure tertiaire induirait un changement subtil de l'environnement d'un ou plusieurs tryptophanes et donc modifierait leur REES.

Le spectre infrarouge de la bande amide I de la NDPK-B fixée ou non, nous a donné des informations sur les structures secondaires de la protéine. L'adsorption de la protéine sur des liposomes induit un changement du rapport feuillet β sur hélice α . On a donc un remodelage des structures secondaires au sein de la NDPK-B lorsque la protéine est fixée.

Titre : Consequences of NDPK-B binding to model liposomes on protein structure and membrane physical state

Auteurs : Francois-Moutal L., Marcillat O., Granjon T.

Article qui sera soumis à publication prochainement

Résumé :

Malgré l'absence de séquence de localisation membranaire ou de domaines de fixation aux membranes, la nucléoside diphosphate kinase B (NDPK-B) est une enzyme cytosolique capable de fixer directement des membranes chargées négativement, via un couple de résidus : Arg-Lys. *In vivo*, elle a été retrouvée associée à plusieurs membranes et plusieurs études montrent son implication au niveau de la membrane plasmique (adhésion, influence sur le transport d'ions, signalisation...)

Nous avons entrepris une étude biophysique sur la caractérisation de la NDPK-B dans un environnement lipidique car il est important de comprendre la contribution de la membrane sur la structure de la protéine et l'effet de cette interaction sur l'état physique des lipides. Les mesures de spectroscopie de fluorescence et infrarouge indiquent que la NDPK-B est capable de diminuer la fluidité membranaire et que la fixation aux phospholipides induit des changements de structures secondaires et tertiaires au sein de la protéine.

Ces résultats font la lumière sur un nouveau rôle de la NDPK-B : celle-ci ne joue pas seulement un rôle dans le métabolisme de la cellule, mais participe également à la structuration de la membrane. Cette propriété pourrait permettre à la NDPK-B de former des plateformes impliquant des phospholipides, conduisant ainsi à la formation ou la stabilisation d'interactions avec des partenaires protéiques qui nécessitent par exemple des nucléotides.

Consequences of NDPK-B binding to model liposomes on protein structure and membrane physical state

Francois-Moutal L.¹, Marcillat O.¹, Granjon T.¹

¹Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, CNRS UMR 5246 ICBMS, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.

Correspondence to: Dr Thierry Granjon, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, CNRS UMR 5246 ICBMS, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.

E-mail: thierry.granjon@univ-lyon1.fr

Abstract

Despite the absence of any structural features that characterize membrane proteins, nucleoside diphosphate kinase -B (NDPK-B) have been found to bind anionic membranes via positively charged residues. We undertook a biophysical study of the characterization of NDPK-B in a lipid environment as it is important to understand the contribution of the membrane to the structure of the protein and its effect on membrane lipid properties. Fluorescence and infrared spectroscopy measurements indicated that NDPK-B is able to lower membrane fluidity and that lipid-binding induced changes in the protein secondary and tertiary structures.

Those results shed light into unknown structural roles for NDPK-B: this enzyme not only plays a role in the metabolism of the cell but may also participate to the structuration of the membrane. NDPK-B is known to interact with intrinsic or peripheral membrane proteins and phospholipidic platform formation could be performed *in vivo* by NDPK-B in order to stabilize such interactions/activation and/or to provide nucleotides such as GTP to GTPases.

Key words: NME2, NDPK-B, plasma membrane, fluorescence, infrared, Brewster angle microscopy

Introduction

Nucleoside diphosphate kinases (NDPK) are enzymes which catalyse the reversible transfer of the terminal phosphoryl group from a di to a triphosphonucleoside (Lascuet Gonin, 2000). Their main role is to maintain the pools of the different nucleotide within the cells at a proper level. The neo-synthetized triphosphates are used in the main anabolic processes, making NDPKs important actors of cellular metabolism involved in prominent processi such as synthesis of nucleic acids, proteins (via GTP)...

Several independent studies have shown that association and interaction of several NDPK isoforms with biological membranes was described in numerous studies (Baughman *et al.*, 2008; Bosnar *et al.*, 2004; Milon *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2009) despite the fact that there is no defined sequence of membrane attachment and few exposed hydrophobic regions.

NDPK-B, a cytoplasmic and nuclear isoform, is retrieved associated with cellular membranes, like plasma membrane where it is supposed to play a role in adhesion (Fournier *et al.*, 2003), signalisation (Rochdi *et al.*, 2004), ion transport (Srivastava *et al.*, 2006)... NDPK-B is also able to bind endoplasmic reticulum and this protein was described as a scaffold molecule of endoplasmic reticulum membranes via its symmetric structure (Baughman *et al.*, 2008). Site directed mutagenesis showed that membrane binding occurs mainly via interaction between anionic phospholipids, and positively charged residues of NDPK-B (Lys56 and Arg58) (Baughman *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2009).

We undertook a biophysical study of the characterization of NDPK-B in a lipid environment as it is important to understand the contribution of the membrane to the structure of the protein and its effect on membrane lipid properties. Fluorescence of Laurdan, red edge excitation shift and infrared spectroscopy were associated, in the present work, to investigate NDPK-B binding to liposomes.

Results showed the ability of NDPK-B to bind anionic phospholipids containing membranes via a strong electrostatic component. A hydrophobic force seemed to contribute to membrane binding but was not sufficient by itself. Lipid-binding induced changes in the protein secondary and tertiary structures have been evidenced by infrared and fluorescence measurements. The effect of NDPK-B on membrane physical state was also investigated in terms of fluidity and hydration. Fluorescence and infrared spectroscopy measurements indicated the capacity of the protein to lower membrane fluidity.

Those results shed light into unknown structural roles for NDPK-B: this enzyme not only plays a role in the metabolism of the cell but may also participate to the structuration of the membrane.

Materials and methods

Materials

Phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS) and phosphatidylinositol (PI) were from Lipid Products. Laurdan was purchased from Fluka. Cholesterol, lactate deshydrogenase and pyruvate kinase came from Sigma Aldrich.

Bacterial expression and purification of human NDPK-B

Wild – type NDPK-B was expressed in *E.coli* from a pET 21b and purified using a modification of an earlier protocol (Engel *et al.*, 1995; Morera *et al.*, 1995b). Briefly, cells were resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 8.4, 1 mM EDTA, sonicated and centrifuged at 20 400 g for 30 min at 4°C. The supernatant was fractionated in 60-90 % saturated ammonium sulphate (Burgess, 2009). The 90 % saturated pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 8.4, 1 mM EDTA, dialysed against the same buffer and loaded on a DEAE-Trisacryl column. The NDPK-B was eluted with 50 mM Tris-HCl, pH 8.4, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂. The purity of the protein was verified on SDS-PAGE.

Assay of NDPK activity

NDPK activity was measured using a coupled lactate deshydrogenase/pyruvate kinase assay, with minor modifications (Agarwal *et al.*, 1978). Briefly, the assays were carried out at 25°C in a 1 mL reaction mixture containing Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, KCl 75 mM, MgCl₂ 5 mM, 1 mM ATP, 0.1 mM NADH, 1 mM phosphoenolpyruvate, 1 mM TDP and 5 U of pyruvate kinase and lactate deshydrogenase.

Preparation of liposomes

Aliquots of the required lipids in chloroform solution are mixed with a molar ratio, i.e: PC(12%)-PE(35%)-PS(22%)-PI(9%)-cholesterol(22%) which mimics the phospholipid composition of the plasma membrane (Stahelin *et al.*, 2003), PC(26%)-PE(44%)-PS(18%)-PI(11%), PC(13%)-PE(38%)-PS(25%)-cholesterol(24%), PC(100%). LUVs were prepared by hydration and extrusion as previously described (Mayer *et al.*, 1986). Briefly, dry lipids were hydrated (20 mg/mL) in a Tris 20 mM, EDTA 0,1 mM pH 7.4 buffer and dispersed to produce MLV. The lipid suspension was subjected to 6 freeze/thaw cycles and then extruded 19 times through a polycarbonate membrane (Nucleopore) with 0.4 and 0.2 µm diameters pores using a mini-extruder (MacDonald *et al.*, 1991).

Interaction of proteins with liposomes

0,5 µM of NDPK were incubated at 25 °C during 20 min with 1 mM of liposomes. The mixture was then centrifuged at 160 000 g during 1 hour with a Beckman airfuge. The supernatant was separated from the pellet and the latter was resuspended in 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM EDTA solution. The percentage of binding was determined using Eq (1)

$$\% \text{binding} = [\text{activity}_{\text{pellet}} / (\text{activity}_{\text{pellet}} + \text{activity}_{\text{supernatant}})] \times 100 \quad (1)$$

Fluorescence measurements

Fluorescence measurements were performed with a Hitachi F4500 fluorometer (150 W Xe). The excitation and emission band-pass values were 5 nm. NDPK-B was incubated with liposomes during 20 min and was then centrifugated at 160 000 g during 1 hour using an Airfuge centrifuge. Spectra were recorded on the pellets using a 1 cm path length thermostated quartz cuvette. All fluorescence spectra were corrected for the baseline spectra of the buffer solution to remove the contribution of the Raman band.

- Membrane fluidity characterisation: excitation Generalized polarization (ex GP):

Experiments with Laurdan were conducted as follows: phospholipids and Laurdan in chloroform solution were mixed in a 400:1 molar ratio, and the liposomes were then prepared as previously described. Spectra were recorded with the following parameters: excitation wavelength ranging from 320 to 420 nm (1 nm gap) and emission wavelength ranging from 420 to 550 nm at 37°C on 150 µg Laurdan-liposomes in the presence of 12 µg NDPK-B.

The excitation generalized polarization was calculated as:

$$GP_{exc} = (I_g - I_l) / (I_g + I_l)$$

Where I_g and I_l are the fluorescence intensities at the maximum emission wavelength in the gel and in the liquid crystalline phases (Parasassi *et al.*, 1991).

- Protein structure assessment: Red Edge Excitation Shift (REES):

As REES measurement permits to monitor the organization and the dynamics of a fluorophore environment under conditions of restricted mobility (Demchenko, 1988; Lakowiczet Keating-Nakamoto, 1984), it was used to characterize the environment of tryptophan residues of free or membrane-bound NDPK-B. REES refers to the increase in the emission wavelength occurring when the excitation wavelength is shifted toward the red edge of the absorption band. When a fluorophore is in a fluid medium the fluorescence emission wavelength is unchanged, irrespective of the excitation wavelength used. However, when the fluorophore is placed in a polar, viscous medium, its mobility is restricted. In such conditions, when the excitation wavelength is gradually shifted to longer wavelengths, a different population of fluorophores is excited and thus the fluorescence emission shifts to longer wavelengths (Chattopadhyayet Rukmini, 1993; Lakowiczet Keating-Nakamoto, 1984).

Assays were carried out using NDPK-B (12 μ g) in 200 μ L of 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.4, in the presence or absence of 150 μ g of liposomes. The maximum emission wavelength was measured at 5 nm excitation wavelength intervals ranging from 275 to 310 nm.

Infrared Spectra

Liposomes (PC(12%)-PE(35%)-PS(22%)-PI(9%)-cholesterol(22%) or without cholesterol) were prepared as previously described, using 20 mM Tris-HCl-²H₂O buffer (Glasoeet Long, 1960).

For assay with protein, the liposome suspension (160 μ g) was mixed with 50 μ g of enzyme in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, and then incubated 20 min. Separation of non-absorbed protein and liposome was performed by centrifugation at 160 000 g for 40 min (Bekcman Airfuge). The pellet was resuspended in 8 μ L of Tris-2H₂O.

Samples were loaded between two BaF₂ circular cells, with a 56 μ m Teflon spacer. FTIR spectra were recorded with a Nicolet FTIR spectrometer which was continuously purged with dry air. 256 scans were collected and co-added per sample spectrum, and Fourier-transformed for each sample. Every FTIR spectrum was representative of at least three independent measurements. The infrared spectra of buffer and residual water vapour were subtracted from the infrared spectrum of the sample.

Results

1. NDPK-B/membrane interaction is mainly electrostatic

NDPK- B was incubated with liposomes and centrifuged during 1 hour at 160 000 g. The pellet was separated from the supernatant, and the NDPK activity was measured in each fraction as described in materials and methods. The results are shown in Figure 1.

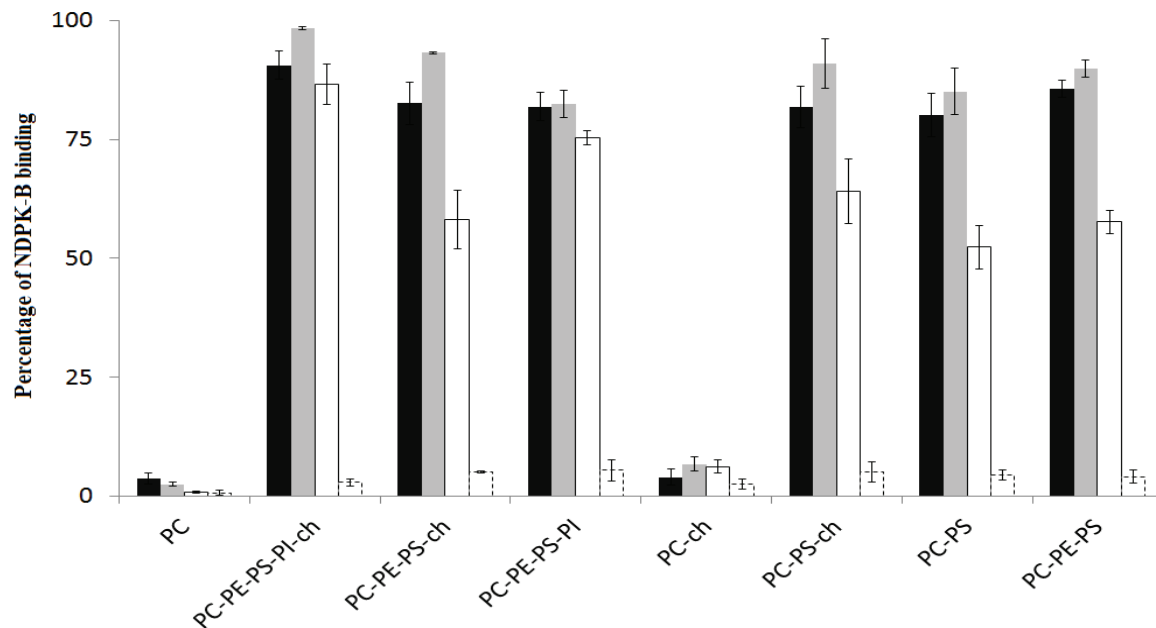


Figure 1 : Effect of NaCl on NDPK-B binding to liposomes. Different concentrations were used: 0mM (black), 50mM (grey), 75mM (white) and 150mM (dotted line). Each column represents the mean \pm S.E.M (bars) of at least three measures.

In presence of anionic phospholipids, the percentage of binding was more than 80%, whereas less than 10% of binding was observed with zwitterionic liposomes. The results also indicate that the presence of an anionic phospholipid, like PS or PI, is necessary for NDPK-B binding, thus suggesting the role of electrostatic interactions in the binding mechanism.

We tested the binding of NDPK-B on PC-PS liposomes (82 %) and we compared it with PC-PS-cholesterol (83%), cholesterol did not affect NDPK-B binding to these membranes. In the same way, experiments monitored with or without cholesterol indicated that the presence of cholesterol increase NDPK-B binding when liposomes contain PI. We verified this result significance by a t-test, the cholesterol effect on NDPK-B binding is highly significant in presence of PI. This might be explained by the formation of cholesterol-PI domains that would be able to enhance NDPK-B binding like hat is described for PIP₂ (Epand, 2008).

The same experiments were repeated in presence of different concentrations of NaCl. In the presence of 50 mM NaCl, NDPK-B binding to anionic membranes was enhanced (from 75-80% to 77-95 % depending on the phospholipid composition), suggesting the presence of a hydrophobic component.

However, with 75 mM NaCl, the attachment of the NDPK-B is weakened, especially when there is no PI in the membrane. This is in line with the results previously obtained by Baughman *et al.* who showed a greater affinity for PI than for PS.

Addition of 150 mM NaCl prevents the NDPK-B binding to all types of membranes. In addition, it is noteworthy that when the previously obtained pellets are resuspended and centrifuged in presence of 150 mM, NDPK-B was desorbed from membranes (not shown). The hydrophobic component of NDPK-B binding is not sufficient by itself to allow the protein binding to membrane.

2. Effect of NDPK-B binding on membrane organisation

2.1. Laurdan GP spectra in liposomes – The excitation GP fluorescence spectra obtained at 37°C allowed us to characterize the effect of the binding of NDPK-B on the phospholipid physical state of PC-PE-PS-PI membranes containing or not cholesterol. This parameter takes into account the variations of the fluorescence intensity of blue and red regions of emission spectra. Laurdan GP spectra, obtained by calculating emission GP values at each excitation wavelength, allowed us to characterize the phospholipid physical state (Parasassi *et al.*, 1991). A remarkable characteristic of GP is its dependence on excitation or emission wavelengths, i.e., the GP spectrum, gives an indication of the membrane physical state including phase coexistence. Indeed, on one hand the wavelength dependence of GP_{exc}, the presence or absence of solvent relaxation explains the behavior of the liquid crystalline state and the gel phase, respectively, while photoselection of Laurdan molecules inserted in the gel phase as the red edge of the excitation spectrum is approached, accounts for the positive slope in phase coexistence.

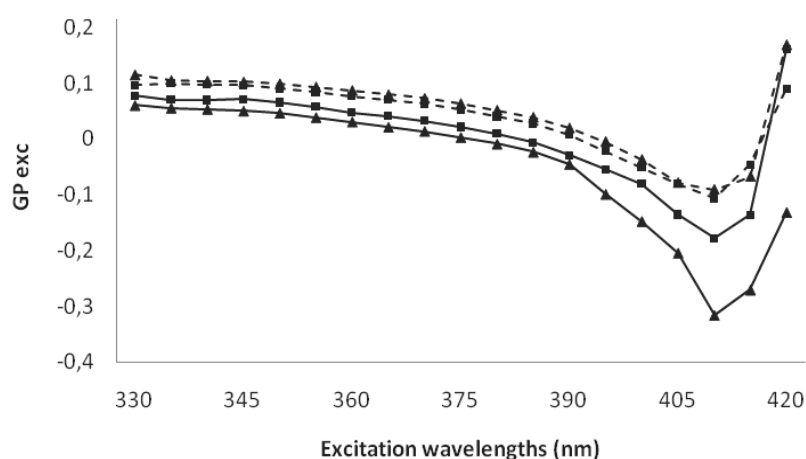


Figure 2: Laurdan excitation generalized polarization spectra (a) in 150 μg of liposomes alone (triangles) or in the presence of 12 μg NDPK-B (squares). The experience was repeated in presence of 150 mM NaCl (---). (b) Variations of excitation GP as a function of excitation wavelengths, where $\Delta GP = \text{excitation GP in presence of protein} - \text{excitation GP in absence of protein}$ (means of three experiments) in presence (---) or in absence (—) of NaCl 150 mM.

In absence of protein, negative slopes were observed on figure 2, indicating a dominant liquid-crystalline state of the membrane (Parasassi *et al.*, 1991; Velazquezet Fernandez, 2006). In presence of NDPK-B, GP values corresponding to PC-PE-PS-PI liposomes are higher than in its absence (figure 2), and are drastically increased above 410 nm.

As the presence of 50 mM NaCl increases NDPK-B binding to membranes, we also measured fluorescence of Laurdan in these conditions and observed that GP values were higher in the presence of protein than in its absence indicating a more important effect of NDPK-B on lipid physical state in presence of 50 mM NaCl (not shown).

These results suggest that Laurdan is inserted in a mixed gel and liquid-crystalline phospholipid state. The binding of the protein to the phospholipid membrane would decrease either the surrounding water mobility, or the number of water molecules.

In order to check whether the modifications observed were effectively due to NDPK-B, the same experiment was carried out in presence of 150 mM NaCl which prevent binding. Results are consistent with this fact, as no difference in the GP values were observed in presence or not of the protein.

Thus, the binding of NDPK-B to liposomes modified the phospholipid fluidity and changed the liquid-crystalline state to a more rigid state, eventually leading to a mixture of lipid states.

The same experiment was conducted on liposomes containing cholesterol (22%), but no differences in the GP spectra, in presence or in absence of NDPK-B, were measured (data not shown). Either NDPK-B binding has no effect on a cholesterol-containing membrane or the binding effect on the lipid physical state is limited and cannot be studied by Laurdan.

Protein effect on lipid infrared absorption bands

Alterations in hydrogen bonding, orientation of the headgroup, and differences in chain packing of phospholipids after NDPK-B binding to the phospholipids bilayer were further monitored at the phosphate group (O-P-O), ester group (C=O) and acyl chains (CH₃ and CH₂) stretching vibration level using infrared spectroscopy (Arrondo *et al.*, 1984; Gericke *et al.*, 1997).

- Phosphate groups:

Binding of NDPK-B to liposomes resulted in a shift of the symmetric PO₂⁻ stretching band respectively from 1050 to 1046 cm⁻¹ for both PC-PE-PS-PI liposomes with or without cholesterol (Figure 3).

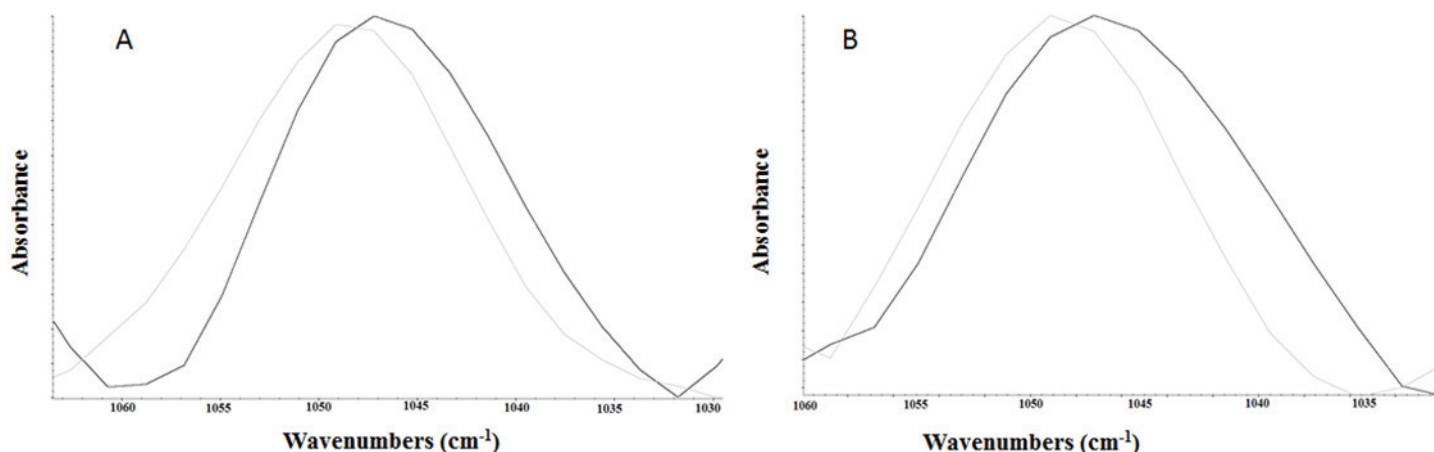


Figure 3 : Infrared spectra in the region of the PO_2^- stretching vibration. 150 μg of PC-PE-PS-PI in presence (A) or not (B) of cholesterol alone (grey) or with (black) 14 μg of NDPK-B. Samples were suspended in 8 μL of 20 mM Tris-HCl- H_2O , p^2H 7.4, as described in Materials and Methods.

One explanation could be that the phosphate moieties become involved in stronger hydrogen bonding interaction and/or in electrostatic interactions with charged groups of the protein. Protein binding to phospholipids would lead to stronger interactions between NDPK-B and phosphate head group than those between phosphate head group and water; inducing an immobilization of polar heads.

- *Ester groups:*

The phospholipid ester bonds ($\text{C}=\text{O}$) stretching vibration of the lipid bilayer were slightly affected by the binding of NDPK-B (Figure 4). In the absence of protein, with both compositions a single broad carbonyl peak centered around 1733 cm^{-1} was observed. This broad carbonyl peak was composed of two separate components, as indicated by second derivative minima (not shown): a “dehydrated” carbonyl (1742 cm^{-1}) and a “hydrated” carbonyl (1727 cm^{-1}) (Lewis *et al.*, 1994). In absence of cholesterol, NDPK-B binding induced a pic broadening.

Addition of NDPK-B (Fig. 5) induced a decrease in the 1742 cm^{-1} contribution in presence of cholesterol, without change in the position of the two components. This thus suggests an increase in the content of dehydrated carbonyl bonds.

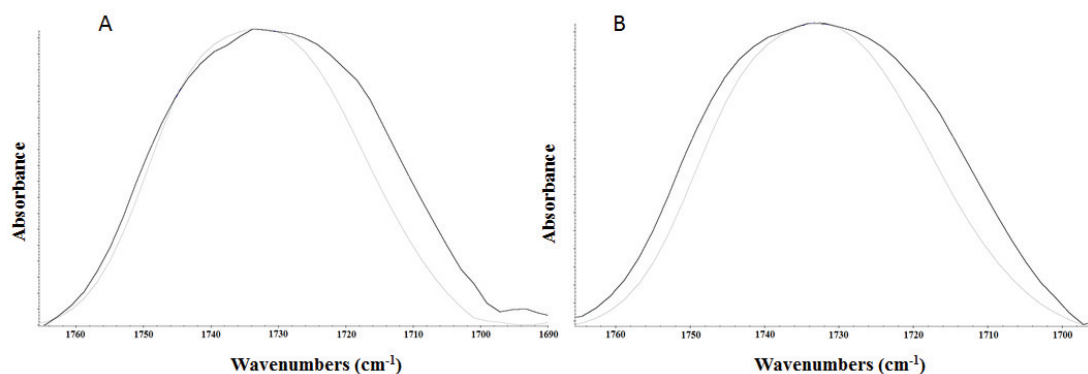


Figure 4 : Infrared spectra in the region of the ester stretching vibration. 150 µg of PC-PE-PS-PI in presence (A) or not (B) of cholesterol alone (grey) or with (black) 14 µg of NDPK-B. Samples were suspended in 8 µL of 20 mM Tris-HCl- 2 H $_2$ O, p 2 H 7.4, as described in Materials and Methods.

- *Acyl chain groups:*

The location of the C-H stretching vibration provides information on of the C-H bond motional freedom: the higher the wavenumber, the greater the acyl chain mobility. Minute variations induced by protein binding can thus be evidenced as a shift in this very sensitive vibrational band (Granjon *et al.*, 2001). As shown in figure 5, adsorption of NDPK-B on PC-PE-PS-PI vesicles led to a shift of symmetrical and asymmetrical CH $_2$ bands from 2921 to 2918 cm $^{-1}$. This shift is lowered by the presence of cholesterol in the liposome composition but it is still present and is the sign of a decrease in the acyl chain mobility under protein binding.

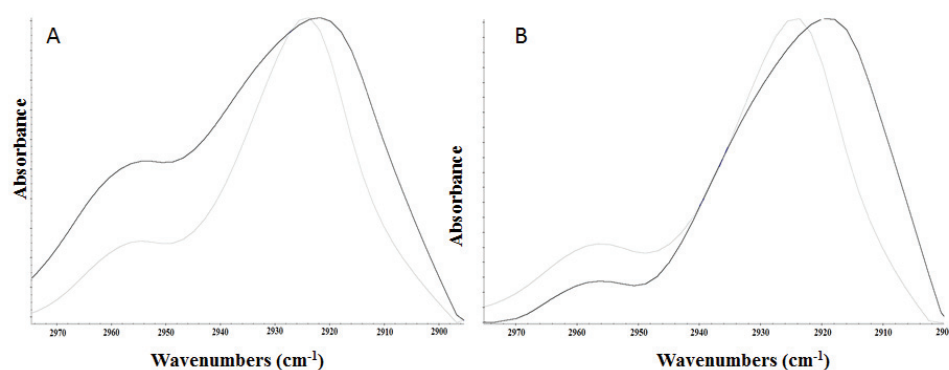


Figure 5 : Infrared spectra in the region of the asymmetric CH stretching vibration. 150 µg of PC-PE-PS-PI in presence (A) or not (B) of cholesterol alone (grey) or with (black) 14 µg of NDPK-B. Samples were suspended in 8 µL of 20 mM Tris-HCl- 2 H $_2$ O, p 2 H 7.4, as described in Materials and Methods.

FTIR spectroscopy was also used to assess the effect of NDPK-B binding to liposomes on the protein structure. The amide I band (1600 to 1700 cm^{-1}), which is dominated by carbonyl vibration, reflects protein secondary structures and is therefore an important tool for analysing changes in protein conformation. Spectra of the amide I region of free or bound NDPK-B are presented in figure 6, and revealed two major contributions: 1653 and 1635 cm^{-1} . The 1650 cm^{-1} band corresponds to α helical structures, while the 1635 cm^{-1} band is related to β sheets ((Barth, 2007; Berthomieu et Hienerwadel, 2009)). When the protein was adsorbed, in presence or not of cholesterol, the amide I band was shifted to higher wavenumbers and then dominated by α helices. This feature is the result of variations of the α/β ratio, with strong decrease in β sheets contribution.

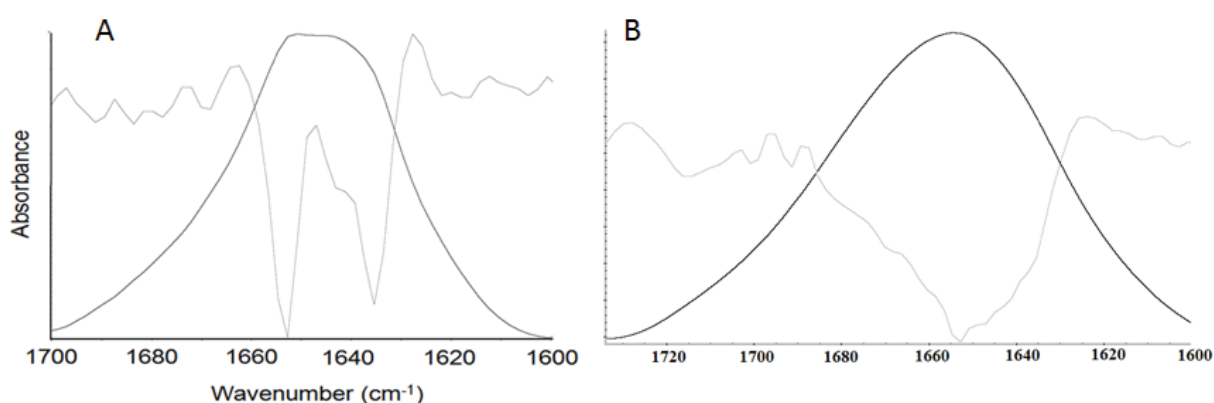


Figure 6 : Infrared spectra (black), in the region of the amide I band, of NDPK-B bound (B) or not to PC-PE-PS-PI-ch (A). In grey is the second derivative.

In order to get more insight into the structural characterization and hypothetical differences between the free and bound enzyme, we performed fluorescence measurements. Tryptophan fluorescence is one of the most widely used tools to probe tertiary structure of proteins. In literature, intensity, quantum yield, and wavelength of maximum fluorescence emission of tryptophane are always described as very solvent dependent (Calliset Liu, 2004). Therefore, embedded or surface exposed, tryptophans show different fluorescence characteristics.

On each of the liposomes-proteins pellets obtained previously, the maxima emission wavelengths were determined for an excitation wavelength of 295nm. The maximum emission wavelength of the protein alone is 339 nm, indicating a quite hydrophilic

environment of the tryptophanes. In presence of liposomes, this maximum is not modified. Those results suggest that none of the tryptophanes is directly implicated in the binding of NDPK-B. Another fluorescence method, namely Red Edge Excitation shift (REES) was chosen to determine if the environment of at least one tryptophane was modified.

The variation of the excitation wavelength of the protein alone, induce a modification of the maximum emission wavelength, from 339 to 344 nm, leading to a REES of 5 nm (Figure 7).

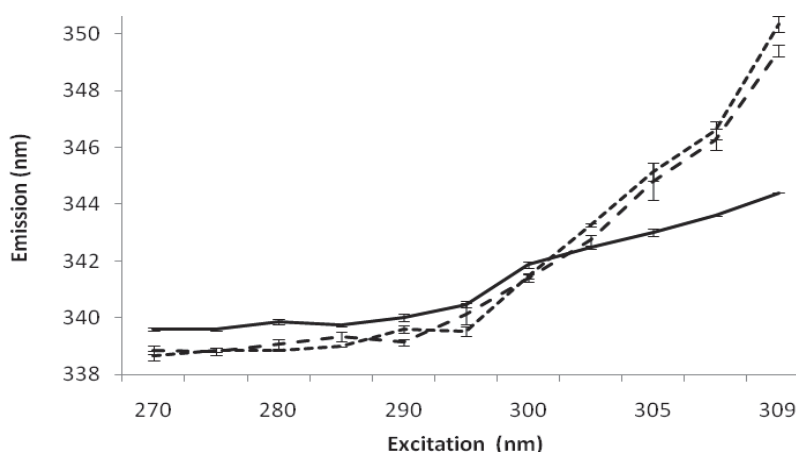


Figure 7: Red edge excitation shift. Maximum wavelength of the emission spectra at different excitation wavelengths of 12 μ g of NDPK-B, in the presence of liposomes with cholesterol (- . -), without cholesterol (- -) or in absence (-). Each point was the average of at least three determinations. The phospholipid to protein molar ratio was 1750. Samples were resuspended in 200 μ L final volume of 20 mM Tris HCl, pH7.4.

In presence of 50 or 150 mM NaCl, NDPK-B REES is almost the same.

The addition of anionic liposomes modifies the profile of the emission spectra. Indeed, below an excitation wavelength of 295 nm, emission maximum of membrane bound NDPK-B is slightly shifted to lower wavenumbers. Whereas, above an excitation wavelength of 295 nm, the binding of NDPK-B to liposomes abruptly shifted the emission maximum to higher wavelengths, up to 350nm, leading to a REES of 10 nm.

This type of modification indicates that the mobility of solvent molecule in the vicinity of at least one tryptophan residue was restricted due to the adsorption of the protein to liposomes. Moreover, the REES is the same whatever the lipid composition was. Binding of NDPK-B to liposomes in presence of 50 mM NaCl, although enhancing the protein binding, led to a smaller REES (about 8 nm). This surprising result is probably due to dehydration occurring from salt solvation. This decrease in the content will restricted the mobility of solvent molecules surrounding Trp residues, thus slightly decreasing the REES.

This indicated that tryptophan residues are localized in a region that offers an important resistance to the solvent moment reorientation. This motionally restricted

environment could correspond to a location in a region that is near the protein-membrane interface, where charge interactions and hydrogen bonding are involved. But giving that 150 mM NaCl are able to desorb the protein from the membrane, it is unlikely that a tryptophane residue would be directly implicated in the binding process.

Alternatively, this REES could result from a structural modification of the protein due to NDPK-B binding to liposomes. This conformational change would decrease the mobility of the environment of some tryptophane residues.

As control, the REES of the desorbed protein (obtained in the presence of 150 mM NaCl) was exactly the same as the free enzyme. This indicates the reversibility of the protein structure modification.

CONCLUSION

NDPK-B, a cytosolic and nuclear isoform of nucleoside diphosphate kinase, has been shown to be involved in several physiological and pathological processes such as apoptosis (Kang *et al.*, 2007), formation of metastasis (Miyazaki *et al.*, 1999)... Since NDPK-B is retrieved bound to the plasma membrane, we analyzed its interaction with phospholipids using liposomes as a biomimetic tool. This study provides new information on protein and membrane structural modifications induced by NDPK-B binding to lipid membranes.

We showed that NDPK undergoes conformational changes upon membrane binding as the fluorescence properties of at least one tryptophan residue is modified and since infrared absorption bands characteristic of α helices and β sheets structures are substantially modified.

A modification of amino acid 3D organisation of a protein can promote, or inhibit, one or several of its functions like enzymatic activity. One has to keep in mind that NDPK-B is a symmetric hexameric protein with six independent catalytic sites. When NDPK-B is bound to lipids by one of its faces, the three catalytic sites of this face are hindered while the three others are functional.

When substrate concentrations are low, the unbound face can use the substrate to provide nucleotides, GTP for example, at the membrane level in the direct vicinity of GTP utilizing sites linked to privileged functions such as GTPases, G coupled receptor proteins. However, higher substrate concentrations lead to NDPK-B release from the membrane (Mitchell *et al.*, 2009).

We also studied the effect of NDPK-B binding on membrane physical using Laurdan, a polar sensitive probe, and infrared spectroscopy. We showed the ability of NDPK-B to decrease anionic membrane fluidity and to dehydrate phosphate, ester and acyl chain groups of lipids. These results may have important physiological consequences as numerous cellular processes are dependent on membrane properties. Indeed, lipids fluidity can influence protein binding to the membrane, lateral diffusion of receptors and lipids, leading to drastic effect on signalisation, endocytosis (Delmaset Lin, 2011; Sanchez *et al.*, 2010)...

Decreasing lipid fluidity can be associated to lipid segregation, as described for several proteins (Francois-Moutal *et al.*, 2013; Maniti *et al.*, 2009). Lipid segregation can lead, *in vivo*, to the formation and/or stabilization of lipid platforms. NDPK-B is known to interact with intrinsic or peripheral membrane proteins : integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 α (ICAP-1 α) in cellular adhesion, thromboxane A2 receptor... Because of its histidine kinase activity, NDPK-B is also able to activate ion canal KCa 3.1. Formation of phospholipidic platforms could be performed *in vivo* by NDPK-B in order to stabilize such interactions/activation and/or to provide nucleotides such as GTP to a specific set of proteins bound to this particular region of the membrane.

NDPK-B has been described as an antimetastatic protein in some cancers (Miyazaki *et al.*, 1999). Several studies show that plasma membrane of metastatic cells exhibit a different fluidity compared to normal cells as Cholesterol/phospholipids and saturated/unsaturated acyl chains ratio are modified (Sherbet, 1989; Zeisig *et al.*, 2007). In the light of these results the antimetastatic effect of this protein on cancer plasma membranes could be linked with modification of local membrane fluidity. This kind of process has been described previously with CLX, an cyclo-oxygenase 2 inhibitor, which presents antimetastatic properties by rigidifying plasma membrane (Sade *et al.*, 2012).

1. Lascu, I. and P. Gonin, *The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases*. J Bioenerg Biomembr, 2000. 32(3): p. 237-46.
2. Baughman, C., J. Morin-Leisk, and T. Lee, *Nucleoside diphosphate kinase B (NDKB) scaffolds endoplasmic reticulum membranes in vitro*. Exp Cell Res, 2008. 314(14): p. 2702-14.
3. Mitchell, K.A., G. Szabo, and S.O.A. de, *Direct binding of cytosolic NDP kinases to membrane lipids is regulated by nucleotides*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1793(3): p. 469-76.
4. Bosnar, M.H., et al., *Subcellular localization of A and B Nm23/NDPK subunits*. Exp Cell Res, 2004. 298(1): p. 275-84.
5. Milon, L., et al., *The human nm23-H4 gene product is a mitochondrial nucleoside diphosphate kinase*. J Biol Chem, 2000. 275(19): p. 14264-72.

6. Fournier, H.N., C. Albiges-Rizo, and M.R. Block, *New insights into Nm23 control of cell adhesion and migration*. J Bioenerg Biomembr, 2003. 35(1): p. 81-7.
7. Rochdi, M.D., et al., *Nm23-H2 interacts with a G protein-coupled receptor to regulate its endocytosis through an Rac1-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2004. 279(18): p. 18981-9.
8. Srivastava, S., et al., *Histidine phosphorylation of the potassium channel KCa3.1 by nucleoside diphosphate kinase B is required for activation of KCa3.1 and CD4 T cells*. Mol Cell, 2006. 24(5): p. 665-75.
9. Engel, M., et al., *A novel serine/threonine-specific protein phosphotransferase activity of Nm23/nucleoside-diphosphate kinase*. Eur J Biochem, 1995. 234(1): p. 200-7.
10. Morera, S., et al., *X-ray structure of human nucleoside diphosphate kinase B complexed with GDP at 2 Å resolution*. Structure, 1995. 3(12): p. 1307-14.
11. Burgess, R.R., *Protein precipitation techniques*. Methods Enzymol, 2009. 463: p. 331-42.
12. Agarwal, R.P., B. Robison, and R.E. Parks, Jr., *Nucleoside diphosphokinase from human erythrocytes*. Methods Enzymol, 1978. 51: p. 376-86.
13. Stahelin, R.V., et al., *The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C- α and group IVa cytosolic phospholipase A2*. J Biol Chem, 2003. 278(14): p. 12452-60.
14. Mayer, L.D., M.J. Hope, and P.R. Cullis, *Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure*. Biochim Biophys Acta, 1986. 858(1): p. 161-8.
15. MacDonald, R.C., et al., *Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles*. Biochim Biophys Acta, 1991. 1061(2): p. 297-303.
16. Parasassi, T., et al., *Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence*. Biophys J, 1991. 60(1): p. 179-89.
17. Lakowicz, J.R. and S. Keating-Nakamoto, *Red-edge excitation of fluorescence and dynamic properties of proteins and membranes*. Biochemistry, 1984. 23(13): p. 3013-21.
18. Demchenko, A.P., *Site-selective excitation: a new dimension in protein and membrane spectroscopy*. Trends Biochem Sci, 1988. 13(10): p. 374-7.
19. Chattopadhyay, A. and R. Rukmini, *Restricted mobility of the sole tryptophan in membrane-bound melittin*. FEBS Lett, 1993. 335(3): p. 341-4.
20. Glasoe, P.K. and F.A. Long, *Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide*. J. Physiol. Chem., 1960. 64: p. 188-190.
21. Epand, R.M., *Proteins and cholesterol-rich domains*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1778(7-8): p. 1576-82.
22. Velazquez, J.B. and M.S. Fernandez, *GPS, the slope of Laurdan generalized polarization spectra, in the study of phospholipid lateral organization and Escherichia coli lipid phases*. Arch Biochem Biophys, 2006. 455(2): p. 163-74.
23. Arrondo, J.L., F.M. Goni, and J.M. Macarulla, *Infrared spectroscopy of phosphatidylcholines in aqueous suspension. A study of the phosphate group vibrations*. Biochim Biophys Acta, 1984. 794(1): p. 165-8.
24. Gericke, A., et al., *Adipocyte fatty acid-binding protein: interaction with phospholipid membranes and thermal stability studied by FTIR spectroscopy*. Biochemistry, 1997. 36(27): p. 8311-7.
25. Lewis, R.N., et al., *Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerol lipid bilayers: a reevaluation*. Biophys J, 1994. 67(6): p. 2367-75.
26. Granjon, T., et al., *Mitochondrial creatine kinase binding to phospholipids decreases fluidity of membranes and promotes new lipid-induced beta structures as monitored by red edge excitation shift, laurdan fluorescence, and FTIR*. Biochemistry, 2001. 40(20): p. 6016-26.
27. Barth, A., *Infrared spectroscopy of proteins*. Biochim Biophys Acta, 2007. 1767(9): p. 1073-101.
28. Berthomieu, C. and R. Hienerwadel, *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*. Photosynth Res, 2009. 101(2-3): p. 157-70.
29. Callis, P.R. and T. Liu, *Quantitative Prediction of Fluorescence Quantum Yields for Tryptophan in Proteins*. J. Phys. Chem. B, 2004. 108: p. 4248-4259.
30. Kang, Y., et al., *NM23-H2 involves in negative regulation of Diva and Bcl2L10 in apoptosis signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 359(1): p. 76-82.

31. Miyazaki, H., et al., *Overexpression of nm23-H2/NDP kinase B in a human oral squamous cell carcinoma cell line results in reduced metastasis, differentiated phenotype in the metastatic site, and growth factor-independent proliferative activity in culture*. Clin Cancer Res, 1999. 5(12): p. 4301-7.
32. Sanchez, S.A., et al., *Lipid packing determines protein-membrane interactions: challenges for apolipoprotein A-I and high density lipoproteins*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1798(7): p. 1399-408.
33. Delmas, D. and H.Y. Lin, *Role of membrane dynamics processes and exogenous molecules in cellular resveratrol uptake: consequences in bioavailability and activities*. Mol Nutr Food Res, 2011. 55(8): p. 1142-53.
34. Francois-Moutal, L., et al., *New insights into lipid-Nucleoside Diphosphate Kinase-D interaction mechanism: Protein structural changes and membrane reorganisation*. Biochim Biophys Acta, 2013. 1828(2): p. 906-15.
35. Maniti, O., et al., *Mitochondrial creatine kinase binding to phospholipid monolayers induces cardiolipin segregation*. Biophys J, 2009. 96(6): p. 2428-38.
36. Sherbet, G.V., *Membrane fluidity and cancer metastasis*. Exp Cell Biol, 1989. 57(4): p. 198-205.
37. Zeisig, R., et al., *Increase in fluidity in the membrane of MT3 breast cancer cells correlates with enhanced cell adhesion in vitro and increased lung metastasis in NOD/SCID mice*. Arch Biochem Biophys, 2007. 459(1): p. 98-106.
38. Sade, A., et al., *Celecoxib reduces fluidity and decreases metastatic potential of colon cancer cell lines irrespective of COX-2 expression*. Biosci Rep, 2012. 32(1): p. 35-44.

4.2. Influence de l'état physique des lipides sur la fixation de la NDPK-B aux membranes

La fixation de la NDPK-B sur des liposomes composés de DMPC, DMPC-DMPG ou DMPC-DMPS a été étudiée en fonction de la température (15 ou 42°C). En absence de protéine, le DMPS présente une température de transition de phase de 35°C et les DMPC et DMPG de 23°C, les membranes étudiées sont donc en phase gel et en phase liquide majoritaire à 15 et 42°C respectivement.

Les résultats sont montrés dans la Figure 40.

Figure 40.

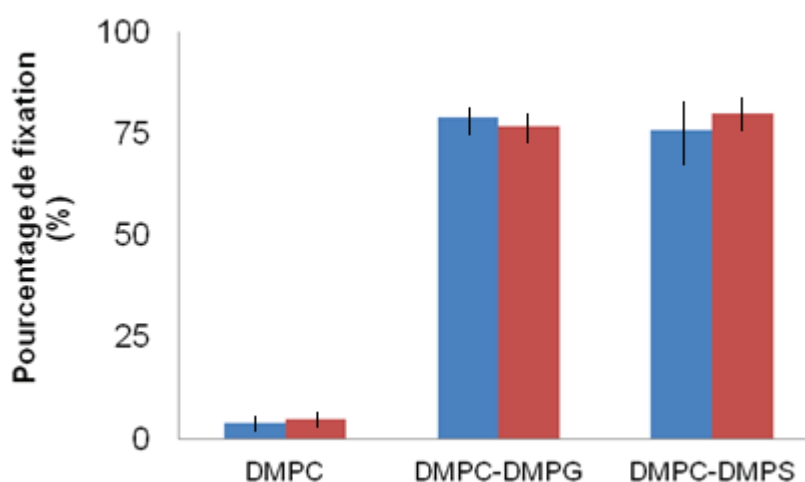


Figure 40 : Histogramme représentant les taux de fixation de la NDPK-B aux différentes vésicules : DMPC (100%), DMPC-DMPS (70 % - 30 %) et DMPC-DMPG (70 % - 30 %) en phase gel, à 15°C (en bleu) et en phase liquide cristalline, à 42°C (en rouge).

Une très faible fixation est observée sur des liposomes de charge globale nulle DMPC (4% de fixation) et ce quelle que soit la température. La quantité de protéine fixée sur DMPC-DMPG et DMPC-DMPS est presque identique (autour de 85%) et cette quantité reste inchangée selon la température d'incubation. L'état physique de la membrane, gel ou liquide, n'affecte donc pas la fixation de la NDPK-B aux membranes.

4.3. Conséquences de la fixation de la NDPK-B sur la température de transition de phase des lipides

L'état physique des lipides n'a aucun effet sur la fixation de la NDPK-B. Nous avons montré dans l'article 3 p109, que cette protéine est capable de diminuer la fluidité

membranaire de membranes modèles. Nous nous sommes alors intéressés à l'effet de la fixation de la NDPK-B sur la transition de phase des lipides. Pour cela, nous avons utilisé des modèles membranaires très simplifiés contenant un phospholipide zwitterionique de type PC, un phospholipide anionique (PG ou PS) et contenant ou non du cholestérol. Ce genre de système très simplifié permet de déterminer précisément les lipides affectés par la fixation de la NDPK-B.

De plus, nous avons choisi d'utiliser des liposomes constitués de lipides dont la température de transition de phase est facile à étudier : les DMPC (23°C), DMPG (23°C) et DMPS (35°C).

Nous avons mesuré les spectres du Laurdan inséré dans différentes compositions de phospholipides à différentes températures, en présence ou non de NDPK-B et nous avons calculé le paramètre GPex (paramètre calculé à différentes longueurs d'ondes d'excitation). Les représentations GPex=f (température) en présence ou non de protéine, ont été tracées et permettent de visualiser de façon directe l'effet de la NDPK-B sur l'état physique des lipides et notamment la température de transition de phase.

Cependant, cette représentation ne permet pas d'estimer la valeur de la température d'apparition de la phase liquide. C'est pourquoi nous avons utilisé les paramètres GPexcS et GPemS, qui sont les valeurs des pentes des spectres GP, comme expliqué dans la partie rappels bibliographiques. Rappelons que pour les spectres de GPexc, une pente négative traduit un état liquide cristallin, une pente positive traduit une coexistence de phase et inversement pour les spectres GPem. Dans les deux cas, une pente nulle peut correspondre (Velazquez et Fernandez, 2006), à l'apparente limite entre la coexistence de phase et l'état liquide cristallin. Cette limite est appelée Tc.

Les représentations de GPexcS et GPemS en fonction de la température permettent d'avoir accès directement à Tc.

La Figure 41A montre les valeurs du GPex de liposomes composés de DMPC-DMPG (70-30) et marqués au Laurdan. Les mesures ont été faites en fonction de la température et en présence ou en absence de protéine.

Nous avons d'abord étudié la composition de type DMPC-DMPG (70 : 30). Cette composition sert de modèle d'étude même si le feuillet interne de la membrane plasmique ne contient pas de phospholipides de type PG, ce lipide apporte la charge négative nécessaire à l'étude. De plus, les lipides DMPC et DMPG présentent l'avantage d'avoir une température de transition de phase identique (environ 22°C).

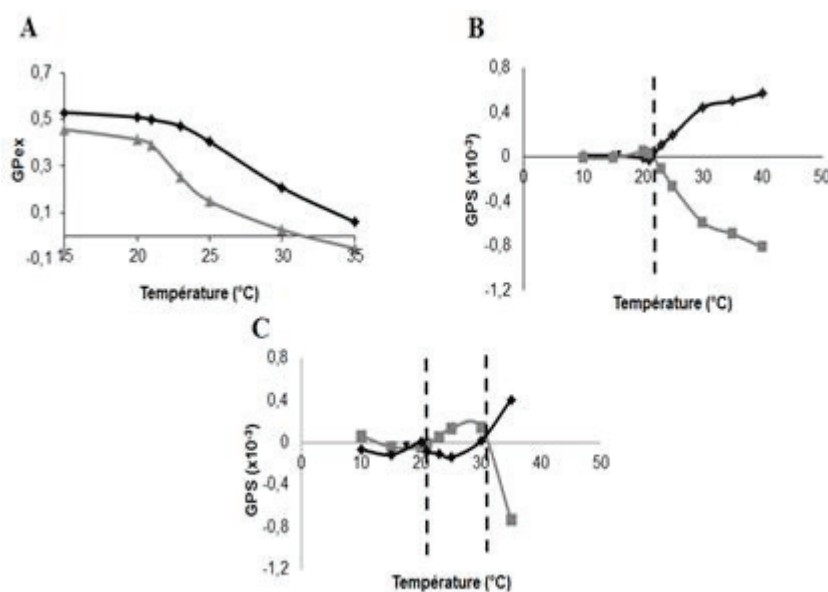


Figure 41 : GPex du Laurdan inséré dans des liposomes de type DMPC-DMPG (70-30) en fonction de la température, en présence (en noir) ou en absence (en gris) de NDPK-B (A). GPexcS (noir) et GPemS (gris) en fonction de la température des liposomes seuls (B). La ligne pointillée de Tc.GPexcS et GPemS en fonction de la température des liposomes en présence de NDPK-B (C).

Sur la Figure 41A, la courbe des liposomes DMPC-DMPG seuls présente un point d'inflexion correspondant à une température de transition de phase entre 21 et 23°C, compatible avec les valeurs des phospholipides seuls de la littérature (Notice Avanti Polar lipids).

Les GPemS et GPexcS du Laurdan inséré dans les vésicules seules (Figure 41B), croisent l'axe des abscisses à 22°C (trait pointillé), la Tc est de cette composition est de 22°C.

En présence de NDPK-B, les valeurs de GP sont plus élevées ce qui indique que la fixation de la protéine sur les liposomes entraîne une diminution de la fluidité de la membrane lipidique. Ceci confirme les résultats obtenus dans l'article précédent. La courbe en présence de protéine est décalée vers la droite et présente une inflexion plus large ce qui signifie qu'en présence de NDPK-B la transition a lieu sur une gamme de températures élargie.

La représentation des GPS en présence de NDPK-B (C), semble plus complexe que celle des liposomes seuls puisque les courbes GPexcS et GPemS croisent deux fois l'axe des abscisses et ce genre de "comportement" n'est pas décrit dans la littérature. Comme le croisement des courbes GPexcS et GPemS au niveau de l'axe des abscisses correspond à une température d'apparition de la phase liquide, l'une des interprétations possibles de ces

résultats est qu'en présence de NDPK-B, on observerait deux T_c : une première vers 20°C et une deuxième vers 30°C.

On sait que la NDPK-B n'est capable de se fixer que sur les phospholipides anioniques, comme DMPG. On pourrait alors supposer que :

- la T_c de 20°C correspond à celle du DMPC, qui n'est pas affectée par la NDPK-B.
- la T_c de 30°C serait celle des molécules de DMPG qui sont en interaction avec la protéine.

Une hypothèse permettant d'expliquer un tel phénomène est qu'il y aurait formation de domaines NDPK-B-DMPG qui conduirait ainsi à la modification de leur température de transition de phase, alors que celle des DMPC et des possibles DMPG libres reste inchangée.

Nous avons ensuite étudié la composition DMPC-DMPG contenant 10% de cholestérol, afin de déterminer si la présence de ce lipide modifie l'effet de la NDPK-B sur la T_c .

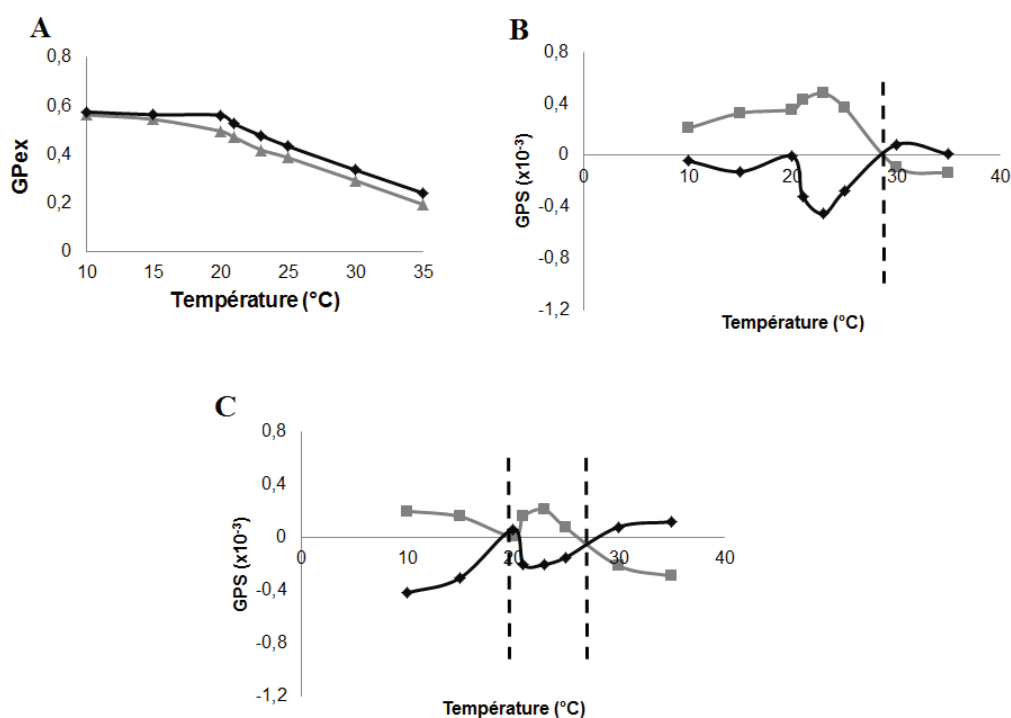


Figure 42 : GPex du Laurdan inséré dans des liposomes de type DMPC-DMPG-cholestérol (60-30-10) en fonction de la température, en présence (en noir) ou en absence (en gris) de NDPK-B (A). GPexcS (noir) et GPemS (gris) en fonction de la température des liposomes seuls (B). La ligne pointillée de T_c . GPexcS et GPemS en fonction de la température des liposomes en présence de NDPK-B (C).

Sur la Figure 42A, il n'y a pas de transition nette de la courbe de GP des liposomes DMPC-DMPG-cholestérol. Le cholestérol provoque un élargissement de l'intervalle de température de transition de phase (Ohvo-Rekila *et al.*, 2002). La Figure 42B montre les

GPexcS et GPemS pour les liposomes DMPC-DMPG-ch seuls. Il semble que la température de transition de phase de cette composition soit de 29°C.

De plus, aucune phase gel n'est observée dans la gamme de température étudiée puisque les valeurs de GPS ne sont jamais égales à zéro, comme rappelé précédemment. Il y a seulement une coexistence de phase.

En présence de NDPK-B, les valeurs de GP sont légèrement supérieures aux valeurs en absence de protéine traduisant un effet de rigidification de la protéine sur la membrane. En présence de protéine (Figure 42C), le profil de GPS ressemble à celui obtenu sur les liposomes DMPC-DMPG. En effet, on observe deux Tc : une à 20°C, qui pourrait correspondre à celle du DMPC ; et une deuxième à 27°C. De manière analogue à ce qui a été dit précédemment, cette deuxième Tc pourrait rendre compte d'un changement d'organisation du DMPG par la NDPK-B, dans le sens d'une fluidification.

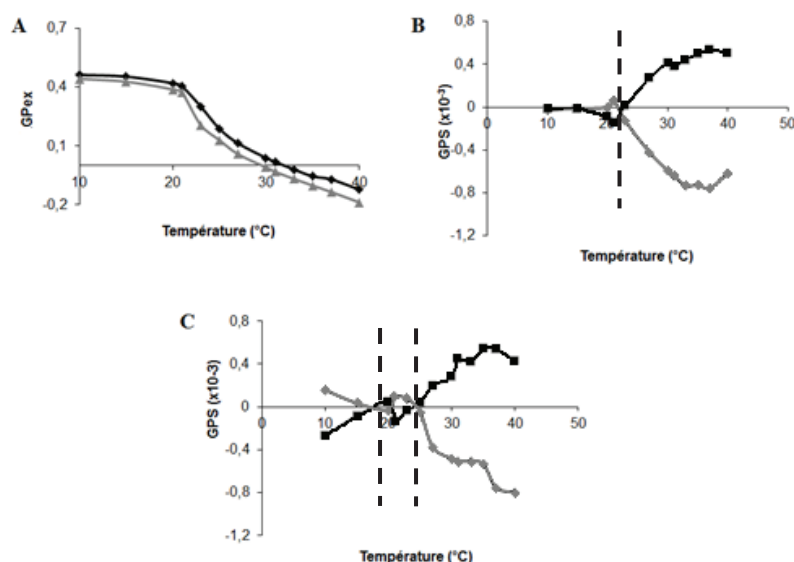


Figure 43: GPex du Laurdan inséré dans des liposomes de type DMPC-DMPS (70-30) en fonction de la température, en présence (en noir) ou en absence (en gris) de NDPK-B (A). GPexcS (noir) et GPemS (gris) en fonction de la température des liposomes seuls (B). La ligne pointillée de Tc. GPexcS et GPemS en fonction de la température des liposomes en présence de NDPK-B (C).

Les résultats obtenus avec les liposomes constitués d'un mélange DMPC-DMPS (Figure 43) sont beaucoup plus difficiles à analyser. Le passage d'un « état gel à liquide » se fait sur un intervalle de température beaucoup plus large que pour la composition DMPC-DMPG sans doute dû au fait que les lipides DMPC et DMPS présentent deux températures de transition de phase : 23°C (DMPC) et 35°C (DMPS) (Notice Avanti polar lipid). La figure B montre que le mélange DMPC-DMPS seul présente les mêmes caractéristiques que le mélange DMPC-DMPG, c'est-à-dire une Tc de 22°C.

En présence de NDPK-B, il y a un décalage des GPex (figure A) qui indique un effet de la protéine sur la transition de phase des liposomes et donc sur la fluidité membranaire, cependant cet effet est plus réduit que sur la composition DMPC-DMPG. Ceci indique que l'effet de la NDPK-B sur la fluidité des liposomes DMPC-DMPS est plus faible.

La représentation des GPS en présence de NDPK-B (Figure 43C), semble plus complexe que celle des liposomes seuls puisque les courbes GPexcS et GPemS croisent deux fois l'axe des abscisses. En présence de NDPK-B, on observe là aussi deux Tc:

- une à 18°C qui correspondrait à celle du DMPC. Ces phospholipides sont affectés par la fixation de la NDPK-B, de manière indirecte, dans le sens d'une fluidification.

- une à 25°C qui serait celle des molécules de DMPS qui sont en interaction avec la protéine. Les lipides DMPS seraient dans un état plus rigide en présence de protéine.

Dans ce cas aussi, une hétérogénéité de la membrane est observée.

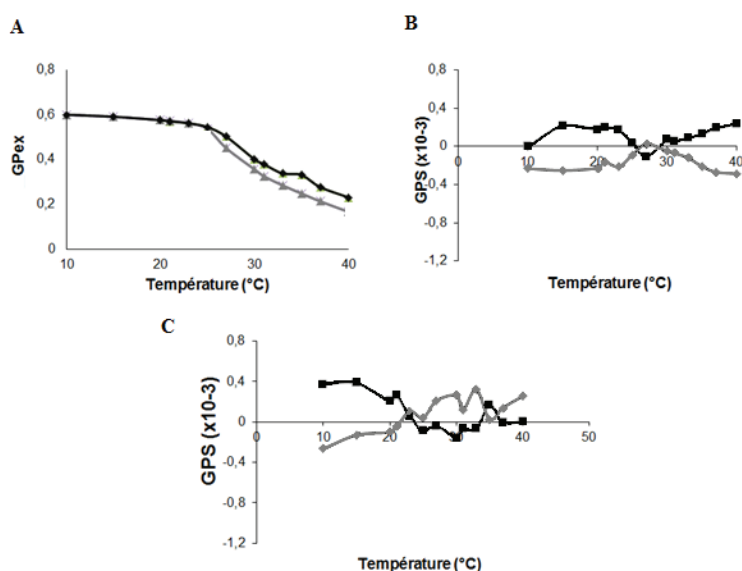


Figure 44 : GPex du Laurdan inséré dans des liposomes de type DMPC-DMPS-cholestérol (60-30-10) en fonction de la température, en présence (en noir) ou en absence (en gris) de NDPK-B (A). GPexcS (noir) et GPemS (gris) en fonction de la température des liposomes seuls (B). GPexcS et GPemS en fonction de la température des liposomes en présence de NDPK-B (C).

La Figure 44 montre les résultats obtenus sur des vésicules DMPC-DMPS-cholestérol (60-30-10). Les résultats en A suggèrent un effet "rigidificateur" de la NDPK-B sur ce type de membrane. Les tracés de GPS sont très complexes à analyser et cependant deux Tc semblent apparaître en absence de NDPK-B. Ceci est sûrement dû à une mauvaise miscibilité DMPC-DMPS mais également à une miscibilité préférentielle du cholestérol avec les phospholipides de type PC par rapport au PS (Epand *et al.*, 2000; Ohvo-Rekila *et al.*, 2002). La membrane présente des zones hétérogènes.

En présence de NDPK-B, ces hétérogénéités sont présentes mais semblent différentes puisque les Tc ne sont plus les mêmes.

La fixation de la NDPK-B aux membranes induit non seulement une modification de l'état physique de celle-ci mais également une réorganisation de la répartition des lipides au sein de la bicouche avec possible ségrégation et formation de microdomaines

4.4. Formation de clusters protéo-lipidiques observés en BAM (expériences préliminaires)

J'ai ensuite essayé de mettre en évidence la formation des hypothétiques domaines lipidiques au sein d'une membrane composée de lipides se rapprochant de la composition de la membrane plasmique avec laquelle la NDPK-B interagit. J'ai étudié l'effet de la fixation de la NDPK-B sur l'organisation latérale des phospholipides au sein de monocouches de lipides mimant la composition du feuillet interne de la membrane plasmique, par visualisation au microscope à angle de Brewster. Cette microscopie, basée sur les propriétés de réflectivité d'une interface air-eau, permet la visualisation directe de la morphologie d'un film monomoléculaire.

La morphologie d'une monocouche de PC-PE-PS-PI en présence et en absence de 4 nM de NDPK-B est présentée dans la Figure 45.

En absence de protéine, la monocouche est homogène et le niveau de gris moyen de l'image permet d'estimer son épaisseur moyenne : 1,8 nm. L'injection de 4 nM de NDPK-B conduit à l'apparition de points brillants.

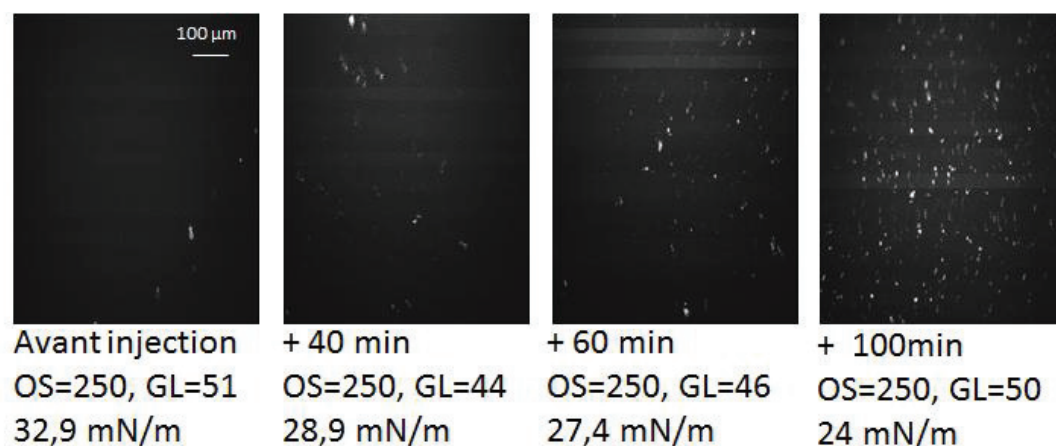


Figure 45 : Images de BAM d'une monocouche de PC-PE-PS-PI en présence de 4 nM de NDPK-B.

Pour déterminer si ces points brillants sont dus à la formation d'un complexe protéine-phospholipide particulier, les expériences sont répétées sur des monocouches de PS pure et de phospholipides zwitterioniques (PC et PC-PE).

L'injection de NDPK-B dans les mêmes conditions sous une monocouche zwitterionique (PC, PC-PE), n'induit aucune modification de la morphologie des films au cours du temps.

Par contre, l'injection de la NDPK-B à une concentration de 4 nM sous une monocouche de PS pure ou d'une monocouche PC-PS (70-30) (non montré) induit deux phénomènes simultanés (Figure 46) :

- Une apparition de régions plus brillantes. La taille et le nombre de ces régions augmentant avec le temps.
- Une augmentation du niveau de gris global de l'image, ce qui traduit une augmentation de l'épaisseur moyenne du film interfacial, due à l'arrivée de molécules de protéine à l'interface lipide-tampon. Avant injection de la protéine, l'épaisseur de la monocouche est estimée à 2 nm.

La NDPK-B est donc capable de former des domaines protéo-lipidiques en présence de PS. Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires. L'étude en BAM de monocouches DMPC-DMPG et DMPC-DMPS en présence de NDPK-B permettrait de valider les hypothèses soulevées dans la partie précédente. La visualisation d'une monocouche PC-PE-PS-PI contenant du cholestérol et en présence de NDPK-B permettrait de mettre en évidence le rôle de ce lipide dans la formation des domaines.

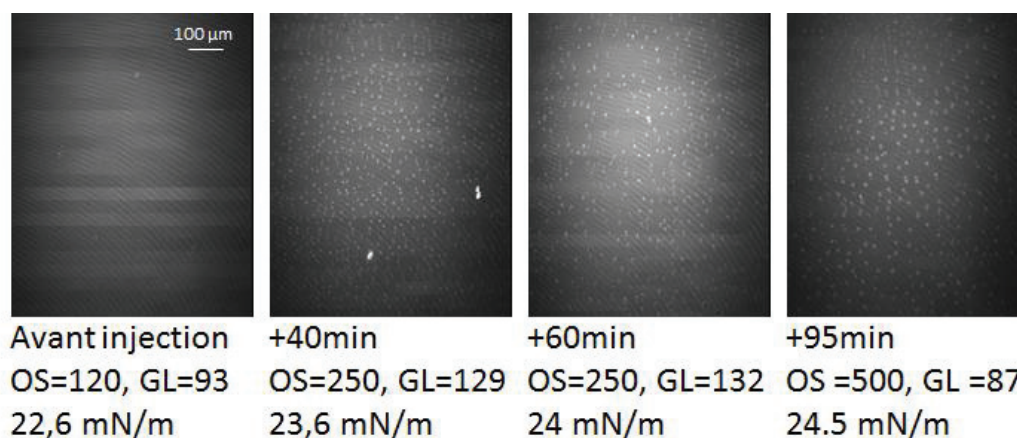


Figure 46 : Images de BAM d'une monocouche de PS en présence de 4 nM de NDPK-B.

4.5. Pénétration de la NDPK-B au sein des membranes biomimétiques

4.5.1. Etude de la pression d'insertion maximale

Pour étudier si la NDPK-B est capable de pénétrer les membranes, des monocouches composées de phospholipides zwitterioniques (DMPC, PC, PE), de phospholipides chargés négativement (PS, PI) et du mélange de phospholipides mimant la composition du feuillet interne de la membrane plasmique (PC-PE-PS-PI-ch) ont été formées à différentes pressions de surface initiales (π_i). Suite à l'injection dans la sous phase d'une concentration finale de 4 nM de NDPK-B, la variation de pression (π) de ces monocouches est suivie au cours du temps.

Toute insertion de molécules de protéine entre les molécules de phospholipides d'une monocouche va se traduire par une augmentation de la pression de surface jusqu'à atteindre une pression stable notée π_e . La Figure 47 représente la variation de pression finale ($\Delta\pi$) reportée en fonction de la pression initiale (π_i). L'extrapolation de cette représentation sur l'axe des ordonnées permet de déterminer la variation de pression théorique induite par une protéine sur une monocouche lipidique à une pression de 0 mN/m (appelée $\Delta\pi_0$), comme montré en orange sur la Figure 47. Les valeurs de $\Delta\pi_0$ obtenues pour chaque monocouche sont représentées dans le Tableau 8.

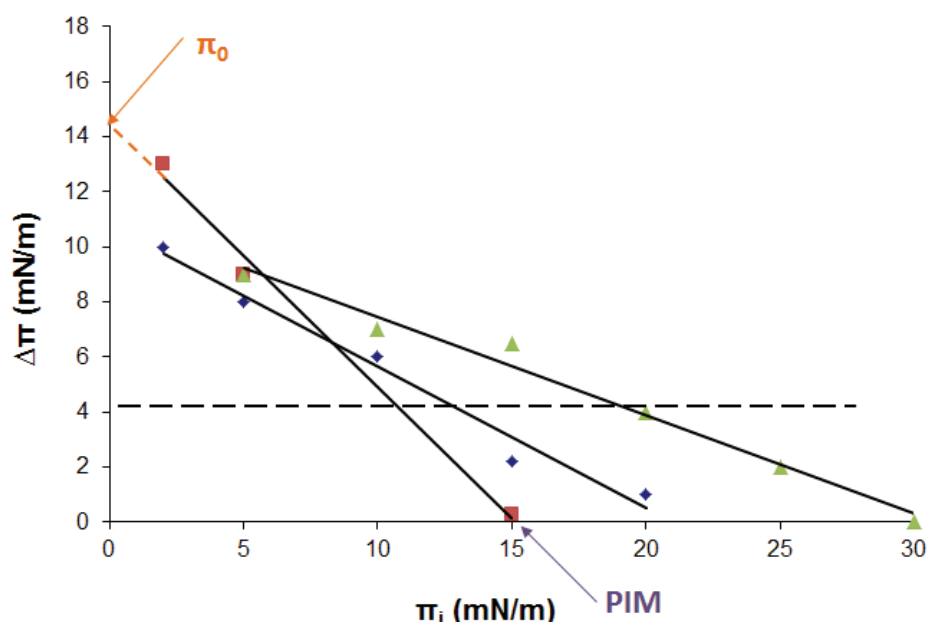


Figure 47 : Effet de l'augmentation de la pression de surface dans une monocouche phospholipidique induite par l'injection de 4 nM de NDPK-B à 21°C. Sous-phase : tampon Tris 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4. En pointillés : la pression maximale induite par 4 nM de NDPK-B à l'interface air-tampon. En vert : monocouche PC-PE-PS-PI-ch. En bleu : PC. En rouge : DMPC.

Monocouche	$\Delta\pi_0$ (mN/m)
PC	11
DMPC	14,5
PE	13
PS	15
PI	10,5
PC-PE-PS-PI-ch	13,8

Tableau 8 : Valeurs des deltas de pressions théoriques à une pression initiale de 0 mN/m ($\Delta\pi_0$) pour différentes monocouches.

Elles sont supérieures à la pression induite par l'injection de NDPK-B à l'interface air-eau dans les mêmes conditions (4 mN/m). Ainsi, puisque $\Delta\pi_0$ n'est pas seulement gouvernée par la tension de surface générée par la protéine, la présence de phospholipides, même zwitterioniques, modifie l'activité de surface de la protéine.

Un deuxième paramètre peut être étudié, c'est la pression d'insertion maximale de la protéine dans la monocouche (PIM), pression au-delà de laquelle la protéine n'est plus capable de s'insérer dans la monocouche. Elle est déterminée en extrapolant la représentation de la Figure 47 sur l'axe des abscisses (en violet sur la Figure 47).

Cependant, afin de discuter au mieux la réalité de ces valeurs de PIM, il est nécessaire de déterminer le facteur de synergie (noté a). Il est déterminé à l'aide de la représentation de la pression stable obtenue après injection de NDPK-B (π_e) reportée en fonction de la pression initiale de la monocouche (π_i) (Calvez *et al.*, 2011). Le facteur de synergie correspond à la pente de cette représentation linéaire (en gris sur la Figure 48). Ce facteur de synergie est défini comme le facteur qui module l'adsorption des protéines sur une monocouche de lipides.

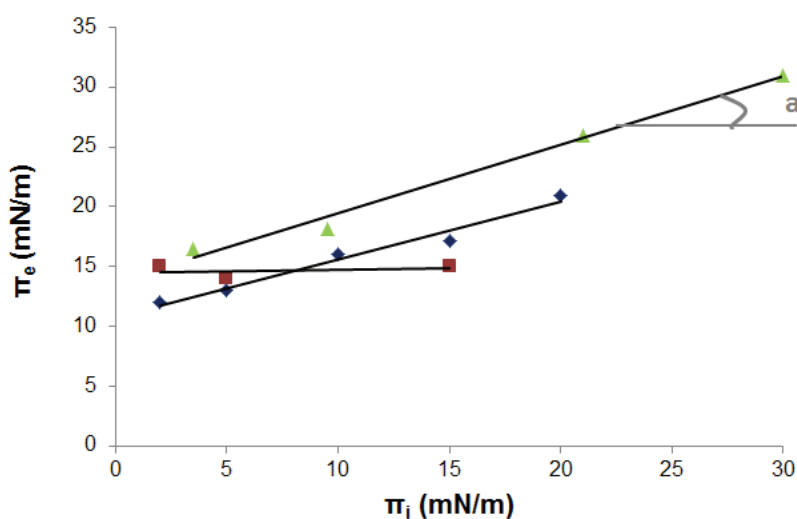


Figure 48: Effet de l'augmentation de la pression de surface dans une monocouche phospholipidique induite par l'injection de 4 nM de NDPK-B à 21°C. En vert : monocouche PC-PE-PS-PI-ch. En bleu : PC. En rouge : DMPC.

Les valeurs de PIM et du facteur de synergie obtenues sont reportées dans le Tableau 9. Lorsque la monocouche est en phase majoritairement gel (DMPC à 21°C), la pression d'insertion maximale est de 15 mN/m. Le facteur de synergie pour cette monocouche est quasi nul (0,02).

La valeur de pression maximale atteinte après injection de la NDPK-B (π_e) est identique à la valeur de pression d'insertion maximale PIM (15 mN/m). La valeur de π_e est indépendante de la pression initiale de la monocouche (π_i), la PIM calculée précédemment correspond alors à ce qu'on appelle une pression de surface stationnaire, parce qu'il n'y a ni attraction, ni répulsion entre la protéine et la monocouche.

Lorsque la monocouche est constituée de phospholipides zwitterioniques naturels, donc dans un état fluide à 21°C (PC ou PE), les valeurs de la pression d'insertion maximale de la NDPK-B sont d'environ 20 mN/m. Lorsque la monocouche contient des phospholipides chargés négativement (PI et PC-PE-PS-PI-ch), la pression limite de pénétration est augmentée jusque 30 mN/m, à une température de 21°C. A cette pression les phospholipides présentent les mêmes caractéristiques thermodynamiques que les phospholipides des membranes biologiques (Marsh, 1996). Il est intéressant de noter que la densité de charges négatives (100% pour une monocouche de PI pure et 30 % pour le mélange PC-PE-PS-PI-ch) ne modifie pas la PIM. Ainsi, la NDPK-B à une concentration de 4 nM ne nécessite que 30 % de charges anioniques pour remonter et pénétrer au sein de la monocouche lipidique.

Monocouche	Pression d'insertion maximale (mN/m)	Facteur de synergie
PC	20	0,48
DMPC	15	0,02
PE	20	0,37
PS	25	0,48
PI	30	0,64
PC-PE-PS-PI-ch	31	0,52

Tableau 9 : Valeurs de pression d'insertion maximale et de facteur de synergie de la NDPK-B pour des monocouches de compositions différentes.

Le cas de la PS est particulier, puisque ce phospholipide présente une pression de collapse de 28 mN/m (Bandorowicz-Pikula *et al.*, 1996), c'est-à-dire qu'au-delà de cette pression l'intégrité de la monocouche n'est pas assurée, les lipides « s'échappent » dans la sous-phase. La valeur de pression limite de pénétration de la NDPK-B de 25 mN/m (et non de 30 mN/m comme pour PI), est donc compréhensible.

Pour toutes ces monocouches, le facteur de synergie est supérieur à 0, ce qui signifie que les valeurs de π_e augmentent proportionnellement à π_i . Par conséquent, l'insertion de la NDPK-B est gouvernée par π_i et par le facteur de synergie positif existant entre la protéine et la monocouche lipidique.

Ceci implique qu'il existe une interaction positive entre la protéine et la monocouche. Cependant, la NDPK-B n'est pas capable d'interagir avec des lipides zwitterioniques (voir article 3), un facteur de synergie de 0,48 pour une monocouche de PC est donc surprenant lorsqu'il est comparé à celui d'une monocouche complexe (0,52).

En conclusion, la NDPK-B présente une pression limite d'insertion aux alentours de 30 mN/m lorsque la membrane contient des phospholipides anioniques (sauf dans le cas particulier d'une monocouche de PS pure).

4.5.2. Polarisation à double interférométrie (réalisée en collaboration avec le Dr Myriam OUBERAI de l'université de Cambridge, Royaume Uni)

Nous avons utilisé la polarisation à double interférométrie (DPI) pour déterminer l'effet de la fixation de la NDPK-B sur les caractéristiques intrinsèques des modèles bicouches membranaires. Cette technique est basée sur l'utilisation des ondes évanescentes générée par un faisceau lumineux éclairant un guide d'ondes. Ces ondes évanescentes vont être affectées par la présence de molécules, comme des lipides, déposées sur le guide d'ondes. Ainsi toute modification dans la masse et/ou l'organisation des molécules déposées va avoir une influence sur ces ondes évanescentes.

Le DPI permet d'étudier deux paramètres : la masse déposée sur le capteur et la biréfringence des molécules (ici d'une bicouche). La biréfringence est un paramètre rendant compte de l'état d'organisation de la bicouche lipidique (ordonné ou désordonné).

4.5.2.1. Caractérisation des bicouches supportées

Il est nécessaire de caractériser au préalable, à l'aide de différents paramètres, les bicouches supportées utilisées en absence de NDPK-B. Ces paramètres sont la masse de lipides déposés sur le capteur qui permet de retrouver l'aire moléculaire des phospholipides, c'est-à-dire la surface disponible pour un phospholipide, et la biréfringence. Trois compositions phospholipidiques ont été utilisées :

-PC

-PC (12 %)-PE (35 %)-PS (22 %)-PI (9 %)

-PC (23 %)-PE (46 %)-PS (22 %)-PI (9 %)-ch (22 %). Cependant cette bicouche n'était pas stable au cours du temps (perte de masse adsorbée sur le capteur), cette composition n'a donc pas été analysée.

Comme décrit dans matériel et méthodes, des liposomes ont été réalisés puis déposés sur une cellule de mesure en présence de CaCl_2 pour former une bicouche supportée. La formation de la bicouche est alors suivie par mesure à 25°C des variations de masse et de biréfringence. Les résultats sont décrits dans le Tableau 10.

La biréfringence rend compte de l'organisation de la membrane (voir rappels bibliographiques p 73). Plus cette valeur est grande, plus le degré d'organisation est grand. La bicouche uniquement composée de PC présente une biréfringence de 0,0149. La littérature indique qu'une bicouche de POPC pure (le composant majoritaire de la PC extraite de jaune d'œuf) présente une biréfringence de 0,0182 dans un tampon 10 mM MOPS, 150 μM NaCl pH 7 (Hirst *et al.*, 2011). On peut envisager deux choses pour expliquer cette différence d'organisation :

Composition lipidique	Mass (ng/mm ²)	Biréfringence	Aire moléculaire (Å ²)
PC	4.74	0.0149	57,6
	±0.12	±0.0005	
PC-PE-PS-PI	4.72	0.0192	47,2
	±0.31	±0.0013	

Tableau 10 : Masse (ng/mm²) et biréfringence des compositions lipidiques utilisées. L'aire moléculaire est calculée en prenant en compte l'aire totale de la surface de dépôts (17 mm²).

- le tampon d'étude de la bicouche POPC est différent
- la PC extraite contient un mélange de molécules avec des chaînes insaturées et saturées ce qui induit un degré d'organisation plus faible et donc une biréfringence plus faible.

La biréfringence de la bicouche PC-PE-PS-PI (0,0192) est plus élevée que celle de PC. La composition utilisée mime celle du feuillet interne de la membrane plasmique et les lipides utilisés sont des lipides naturels extraits. Lee *et al.*, 2010, montrent une biréfringence de 0,0195 pour une bicouche formée à partir de lipides extraits de *E. coli*. On est dans la même

gamme de biréfringence, l'organisation des lipides de la bicouche PC-PE-PS-PI semble donc correcte.

L'aire moléculaire est calculée à partir de la masse de lipides déposés sur le capteur de mesure. Dans le cas de la bicouche de PC de jaune d'œuf, une aire moléculaire de 58 \AA^2 est trouvée et est comparable à celle estimée précédemment au laboratoire grâce à des mesures de pression de surface (60 \AA^2) (Vernoux, 2005).

4.5.2.2. Interaction de la NDPK-B avec les bicouches supportées

Nous avons ensuite étudié la variation de ces paramètres suite à l'injection de NDPK-B. Les résultats sont présentés dans la Figure 49.

La Figure 49A montre la variation de masse au cours du temps en présence d'une bicouche PC-PE-PS-PI. Suite à l'injection de NDPK-B, celle-ci interagit avec la membrane avec un temps de latence de près de 30 s et il y a apparition d'un plateau au bout de 90 s, correspondant à la quantité maximale de protéines fixée dans ces conditions. Lorsque l'injection est stoppée et la membrane rincée (flèche) par le même tampon que celui utilisée lors de la phase de mise en contact (20 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,4), il y a une diminution de la masse, traduisant une désorption partielle de la NDPK-B.

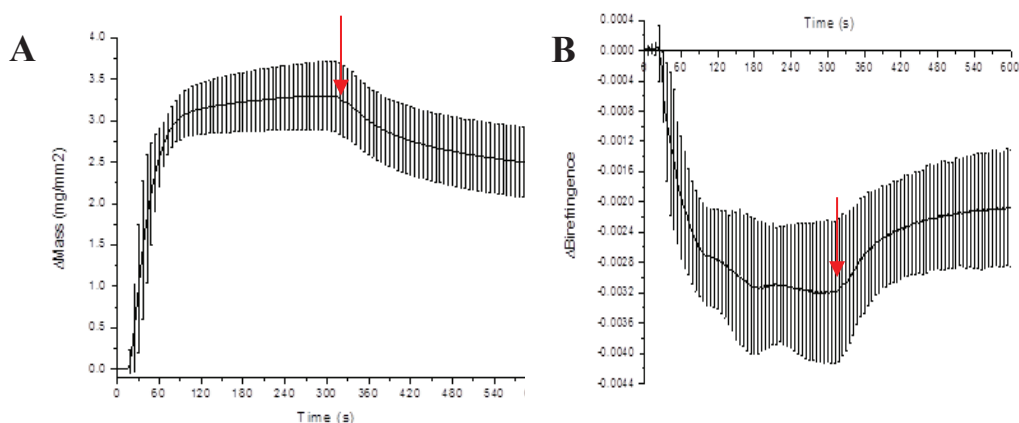


Figure 49 : Variation de la masse (en ng/mm^2) en fonction du temps (s) suite à l'injection de $1 \mu\text{M}$ de NDPK-B sur une bicouche de PC-PE-PS-PI pendant 5 minutes (A). Variation de la biréfringence au cours du temps suite à l'injection de $1 \mu\text{M}$ de NDPK-B sur une bicouche de PC-PE-PS-PI pendant 5 minutes (B).

La Figure 49B montre la variation de biréfringence au cours du temps sur cette même bicouche. On observe une baisse de la biréfringence très rapide suite à l'injection de la NDPK-B. Lorsque l'injection est stoppée et la membrane est rincée (flèche), la biréfringence

augmente, de manière analogue à la diminution de masse. Cette augmentation rend compte d'une perturbation de la membrane suite à l'interaction de la NDPK-B avec la bicouche.

Les graphes de variation de biréfringence en fonction de la variation de masse, présentés en Figure 50, permettent de mettre en évidence un mécanisme d'interaction de la NDPK-B avec les différentes membranes étudiées. Le tableau B de la Figure 50 résume les caractéristiques de l'interaction en termes de variation de masse et de biréfringence et leur traduction en termes de perturbation de l'ordre de la membrane. Il permet une comparaison simple et rapide de l'effet de la NDPK-B selon la composition en phospholipides.

Dans le cas de la membrane PC (en vert), on ne remarque qu'un léger changement de la variation de masse, et de la variation de biréfringence. Comme attendu des résultats précédents, ceci indique une faible interaction PC-NDPK-B. La variation de masse pour la bicouche PC est de 0,13 ng/mm², ce qui est faible par rapport à ce qui est mesuré avec PC-PE-PS-PI et reste marginal. La variation de biréfringence est elle aussi faible et traduit une perturbation de la membrane de l'ordre de 1,6 % par rapport à la valeur initiale de biréfringence. La NDPK-B n'interagit que très peu avec cette bicouche et n'induit pas de perturbation significative de la membrane.

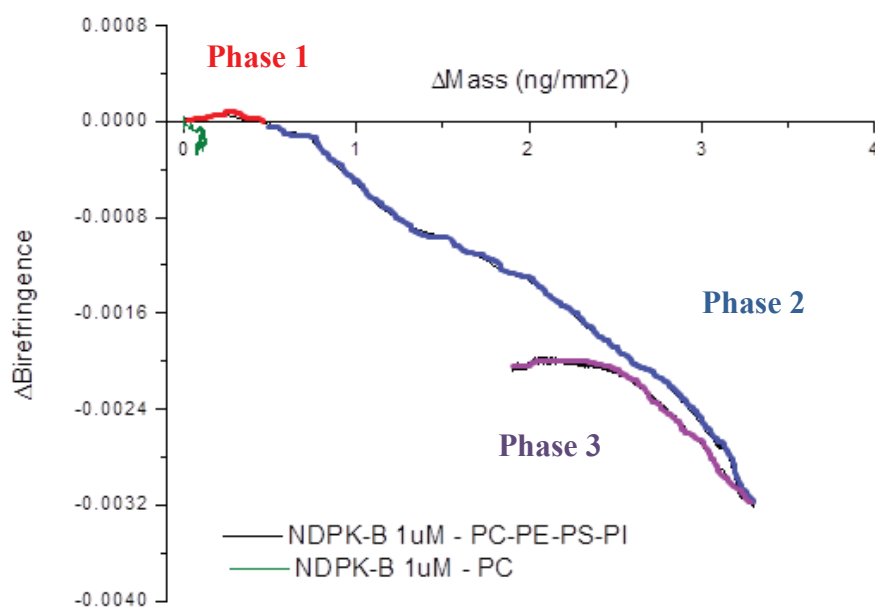
Dans le cas de la composition PC-PE-PS-PI on peut observer une diminution plus importante de la biréfringence associée à une augmentation de masse.

Cette augmentation de masse correspond à la quantité de NDPK-B qui interagit avec la bicouche et traduit une interaction plus importante de NDPK-B avec cette composition lipidique par rapport à la bicouche PC. La variation de masse obtenue pour 1 µM de NDPK-B est de 3,29 ng/mm² (voir tableau de la figure 38). La comparaison de cette valeur avec d'autres valeurs de la littérature est difficile car les études réalisées, en général sur des peptides, ne précisent pas le pourcentage de fixation des protéines.

Dans le cas de la bicouche PC-PE-PS-PI, la biréfringence diminue de 17% par rapport à sa valeur initiale, et est associée à une augmentation significative en masse.

Une des hypothèses expliquant une variation de biréfringence, pourrait être la réorganisation des lipides induite par l'adsorption de la protéine sur la bicouche. Cependant, cette variation de 17 % est trop élevée pour qu'une interaction à l'interface seule ait lieu (Lee *et al.*, 2010a).

Une autre hypothèse serait la liaison de la protéine en surface de la bicouche qui s'accompagnerait d'une pénétration au sein des phospholipides au niveau des têtes polaires. Il faudrait réaliser le même genre de manipulation avec une protéine dont on connaît le mode d'interaction (pénétration ou non, quelle profondeur,...) pour valider cette hypothèse.



Composition lipidique	$\Delta Mass$ (ng/mm ²)	$\Delta Birefringence$	Perturbation de la membrane
PC-PE-PS-PI	3.29 ± 0.41	-0.0032 ± 0.0009	- 17%
PC	0.13 ± 0.04	-0.00024 ± 0.00002	- 1.6%

Figure 50 : Variation de biréfringence en fonction de la variation de masse (ng/mm²) suite à l'injection de NDPK-B sur les deux bicouches étudiées (A). En présence de la bicouche PC-PE-PS-PI, trois phases sont observées : la phase 1 (en rouge) correspond à une phase d'association NDPK-B/têtes polaires des phospholipides, la phase 2 (en bleue) où la membrane est perturbée et la phase 3 (en violet) qui est la phase de dissociation partielle de la NDPK-B. Paramètres de l'interaction de la NDPK-B avec les deux bicouches supportées (B).

A titre de comparaison, un peptide antimicrobien de type Novocidin connu pour former des pores, induit, pour une composition lipidique de DOPC-DOPG 80 : 20, à une concentration de 20 μM , une variation de masse de 2,2 ng/mm² et une variation de biréfringence de plus de 60 % (Nielsen et Otzen, 2010).

De plus, on peut noter une association en deux phases, une première phase (en rouge sur la figure) pour laquelle la biréfringence varie très peu avec l'augmentation de masse, ce qui peut se traduire par une interaction au niveau des têtes polaires qui n'induit aucune perturbation de la membrane puis une phase (en bleu) pour laquelle la diminution de biréfringence devient significative et traduit ainsi une perturbation de l'ordre de la membrane.

Cette diminution est suivie par une phase de dissociation (en violet) qui annule en partie les changements structuraux qui ont eu lieu lors de l'étape de fixation. Ce type de fixation-dissociation peut indiquer que la fixation de la NDPK-B induit une baisse significative de la biréfringence mais n'a pas d'effet permanent sur la structure de la membrane, ce qui suggère que la protéine ne pénètre que partiellement la membrane. Alternativement, cette dissociation pourrait ne faire intervenir que 30% de la NDPK-B puisque le retour à zéro n'est pas complet. On pourrait imaginer que cette fraction n'a pas pénétré la bicouche et est facilement dissociée par le flux de tampon. L'autre fraction est plus ancrée et résiste au lavage. Dans les deux interprétations possibles, la NDPK-B pénètre partiellement la bicouche lipidique.

4.6.Agrégation des liposomes par la NDPK-B

La NDPK-B est une protéine symétrique capable comme la NDPK-D de ponter les membranes. Nous avons donc étudié sa capacité à faire agréger une suspension de liposomes par mesure de diffusion de la lumière.

Les essais sont effectués en ajoutant des quantités croissantes de NDPK-B à une même quantité de liposomes PC-PE-PS-PI-ch (20 µg) et la diffusion est suivie par la variation de l'absorbance à 450 nm.

Le diamètre des liposomes utilisés est de 120 nm. L'utilisation d'une longueur d'onde de 450 nm permet de mesurer la diffusion de structures dont la taille correspond donc à un réseau de 2 liposomes. Les résultats sont présentés dans la Figure 51.

En absence de protéine ou en absence de liposomes, il n'y a aucune variation de turbidité au cours du temps. L'addition de NDPK-B à une suspension de vésicules est suivie d'une augmentation immédiate de l'absorbance à 450 nm, qui tend à se stabiliser avec le temps. La raison de cette augmentation est la formation de particules suffisamment grosses capables de diffuser la lumière à cette longueur d'onde. Ces résultats sont en accord avec ceux de Baughman, 2009.

Les tests dans les mêmes conditions avec des liposomes 100% PC ne présentent aucune variation de turbidité en présence de protéine (non montré). Ce résultat est en accord avec le fait que la NDPK-B n'est pas capable de se fixer sur les liposomes zwitterioniques. La variation de turbidité est donc bien liée à l'agrégation des liposomes par la NDPK-B.

Les expériences ont été répétées en présence de différentes concentrations en NaCl, afin d'étudier l'effet de la force ionique du milieu sur l'augmentation de l'absorbance à 450 nm (Figure 52).

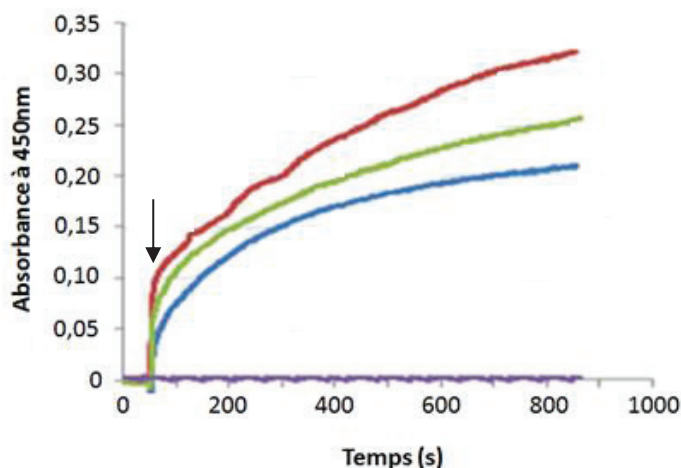


Figure 51: Variation d'absorbance en fonction du temps. Une quantité de NDPK-B variable (0 µg : violet ; 20 µg : bleu, 30 µg : vert ; 60 µg : rouge) sont ajoutés à 20 µg de liposomes PC-PE-PS-PI-ch. La flèche correspond à l'injection de la NDPK-B dans le milieu réactionnel.

Les résultats montrent que la présence de 50 et 75 mM NaCl n'a aucun effet sur la turbidité de la suspension de liposomes. En présence de NDPK-B et lorsque le milieu contient 50 mM NaCl, l'augmentation de l'absorbance est supérieure à celle obtenue en absence de sels. A des concentrations en NaCl égales ou supérieures à 75 mM, aucune augmentation d'absorbance n'est observée. L'augmentation de la concentration en NaCl empêche donc la formation des agrégats. Ceci est en accord avec les résultats de fixation montrés dans l'article 2 qui indiquent que des quantités croissantes de sels diminuent l'interaction NDPK-B/membrane.

A partir des résultats obtenus précédemment, nous avons représenté la valeur d'absorbance en fonction de la quantité de NDPK-B ajoutée à 20 µg de liposomes en présence ou non de concentrations croissantes de NaCl après 40 min d'incubation.

A 75 mM NaCl, deux plateaux sont observés. A faibles quantités de NDPK-B (en rouge), la concentration en NaCl est suffisante pour diminuer l'interaction entre la protéine et les liposomes entraînant une faible quantité de réseaux protéo-lipidiques formés. A partir de 25 µg de NDPK-B (en bleu), on observe une agrégation des liposomes par la NDPK-B. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer ce phénomène. Soit le NaCl n'est plus en quantités suffisantes pour empêcher l'interaction protéine-lipides, soit il existe un autre mode

d'interaction avec une plus faible affinité qui n'est observé qu'à plus fortes concentrations en NaCl et qui n'est pas ou moins sensible à la force ionique.

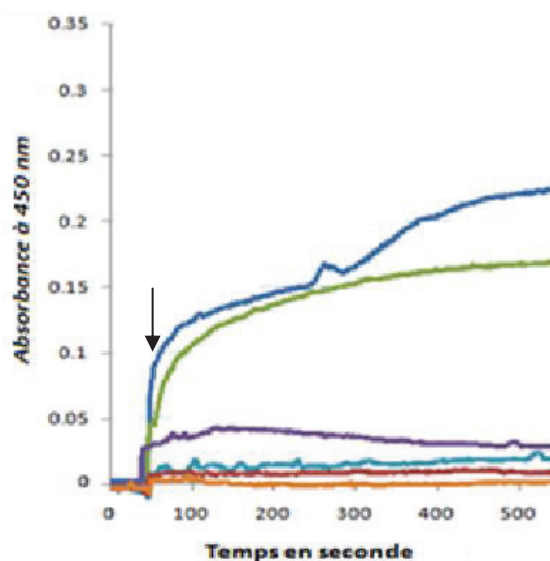


Figure 52 : Variation d'absorbance à 450 nm de liposomes PC-PE-PS-PI-ch suspendus dans des tampons de différentes forces ioniques. Les courbes orange, rouge et turquoise correspondent aux mesures faites à 0, 50 et 75 mM de NaCl en absence de NDPK-B. Les courbes vert, bleu de violet à celles faites en présence de cette enzyme. La flèche indique le temps auquel l'enzyme, ou le volume équivalent de tampon, a été injecté.

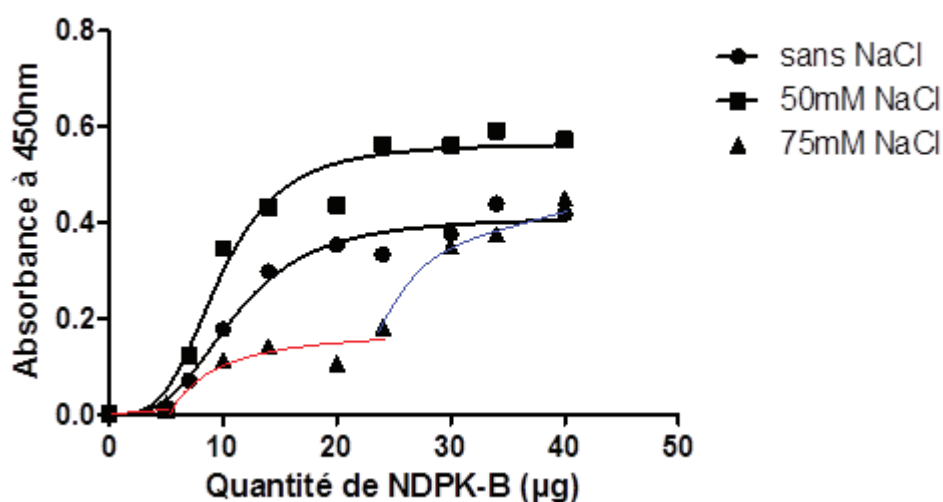


Figure 53 : Variation de DO à 450nm d'une suspension de liposomes (PC-PE-PS-PI-ch ; 20µg de lipides) en fonction de la quantité de NDPK-B ajoutée.

Ceci confirme que l'interaction NDPK-B se fait via des interactions électrostatiques mais également par des interactions hydrophobes de moindre importance.

Pour déterminer la nature des forces qui maintiennent ces structures protéo-lipidiques, nous avons étudié l'effet du NaCl et, comme les substrats ont une influence sur la fixation de

la protéine (Mitchell *et al.*, 2009), de l'ajout d'un substrat de la NDPK-B, l'ATP, sur des réseaux protéines-vésicules déjà formés.

Pour cela, la protéine est incubée avec les liposomes dans les mêmes conditions que précédemment. Lorsque le plateau est atteint, signe que la formation des réseaux est arrêtée, l'injection de NaCl ou d'ATP est réalisée. Les résultats sont montrés dans la Figure 54.

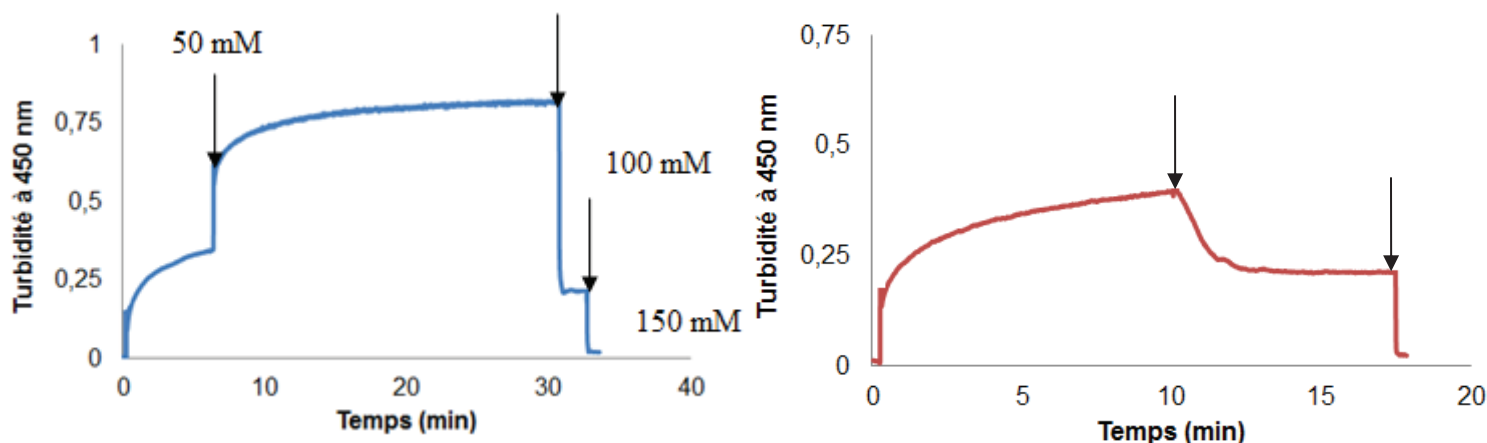


Figure 54 : Turbidité d'une solution de NDPK-B en présence d'une suspension de liposomes PC-PE-PS-PI suite à des ajouts successifs de NaCl 50 mM (A) ou d'ATP 2 mM (B). Les flèches correspondent aux moments des injections.

Comme décrit précédemment, l'ajout de 50 mM final de NaCl augmente la diffusion, l'agrégation est favorisée. Cependant, lorsque que le milieu contient 100 et 150 mM NaCl, on observe une diminution de la turbidité du milieu jusqu'à revenir à l'état basal. Les structures agrégées sont dissociées. Ceci signifie que les réseaux sont maintenus principalement par des forces électrostatiques.

L'ajout de substrat à forte concentration, provoque le même effet mais avec une cinétique plus lente. Ceci confirme les résultats qui montrent que la fixation de la NDPK-B est dépendante de la quantité de substrat dans le milieu (Mitchell *et al.*, 2009). Lorsque la concentration en substrat atteint 2 mM, une fraction de l'enzyme n'est plus capable d'interagir avec les membranes et est décrochée, les réseaux protéo-lipidiques sont détruits en partie.

Les complexes NDPK-B/liposomes sont donc des réseaux de vésicules liées entre elles par une ou plusieurs molécules de protéines sans phénomènes de fusion. En effet, l'addition de NaCl permet de ramener la turbidité à sa valeur initiale (fig 40) or s'il y avait fusion de liposomes, on aurait variation de la taille et de la concentration des objets diffusants et donc de la lumière diffusée

Visualisation de l'agrégation par microscopie épifluorescence

Les résultats précédents indiquent clairement l'aptitude de la NDPK-B à provoquer la formation de complexes agrégés de liposomes contenant des phospholipides chargés négativement.

Nous avons essayé de visualiser ces agrégats NDPK-B-vésicules par microscopie en utilisant des liposomes géants qui renferment un phospholipide fluorescent, le NBD-PE. Cette sonde est utilisée car le marquage fluorescent étant situé sur la tête du phospholipide et donc accessible à la protéine, nous avons choisi le marquage sur la PE car la NDPK-B ne présente aucune affinité pour ce phospholipide.

Les liposomes géants sont préparés par hydratation douce comme décrit dans matériels et méthodes. La Figure 55, obtenue par microscopie d'épifluorescence illustre l'aspect des vésicules seules et des complexes NDPK-B-liposomes.

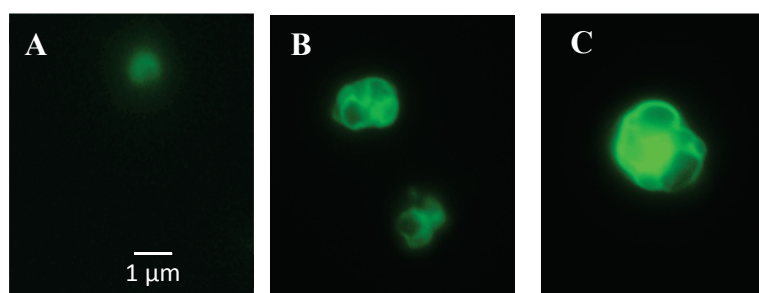


Figure 55 : Visualisation de GUVs en épifluorescence. A. GUVs en absence de NDPK-B au grossissement x63. B. et C. en présence de 2 μ M De NDPK-B, grossissement x63.

Les résultats montrés en A, correspondent aux GUVs en absence de NDPK-B. Les liposomes ont une forme sphérique, la sonde présente une fluorescence assez faible et est très sensible au photoblanchiment. En présence de NDPK-B (B et C), les vésicules commencent à s'agréger et on observe la formation de structures composées d'un amas de liposomes.

Des amas de taille plus importante, de type grappe de raisin, ont été observés, mais il nous a été impossible d'obtenir une image correcte.

Il serait intéressant de refaire ces manipulations avec une autre sonde moins sensible au photoblanchiment (comme le LAURDAN par exemple) et à l'aide d'un vidéo microscope confocal, qui permettrait d'une part de voir la formation de ces structures agrégées et peut être de visualiser correctement les supercomplexes NDPK-B-GUVs.

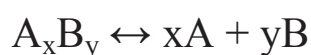
Comme le laissaient supposer les résultats de turbidité, la NDPK-B est bien capable de ponter des vésicules ce qui conduit à la formation de réseaux protéolipidiques.

4.7. Expériences préliminaires de calcul de constante de dissociation

Nous avons vu précédemment la capacité de la NDPK-B à interagir avec les liposomes dont la composition mime celle du feuillet interne de la membrane plasmique via une composante électrostatique majoritaire et une composante hydrophobe de moindre importance. Dans l'article 3, nous avons montré une fixation plus importante de la NDPK-B sur des liposomes contenant du PI en présence de cholestérol. Le but est donc de déterminer l'affinité de la NDPK-B pour ces liposomes et de déterminer sa préférence envers un phospholipide particulier, via la mesure du K_D (constante de dissociation)

La constante de dissociation est la constante d'équilibre associée à la dissociation d'un composé chimique.

Si un composé de formule $A_x B_y$ se dissocie selon la réaction :



Alors la constante de dissociation K_D est :

$$K_D = \frac{[A]^x \times [B]^y}{[A_x B_y]}$$

Une quantité constante de NDPK-B (1 μM) est ajoutée à des liposomes dont la quantité de lipides accessibles à la protéine (donc la quantité de lipides dans un demi-feuillet) varie de 0 à 400 μM qsp 50 μL de tampon Tris 20 mM, KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4.

Les compositions étudiées sont PC-PE-PI-PS-cholestérol, PC-PE-PS-cholestérol et PC-PE-PI-cholestérol. Elles présentent toutes 30% de charges négatives afin de déterminer si la NDPK-B présente une affinité particulière pour la nature de la tête polaire chargée négativement.

La Figure 56A montre le pourcentage de fixation de la NDPK-B en fonction de la concentration en lipides accessibles. Les données sont ajustées par régression non linéaire à l'aide d'un modèle simple à un site de fixation ce qui permet de calculer le K_D . Ce modèle est vérifié à l'aide des calculs de résiduelles (Figure 56B) (différence entre valeurs mesurées et valeurs du modèle) qui permettent de regarder la répartition des points autour de la valeur cible.

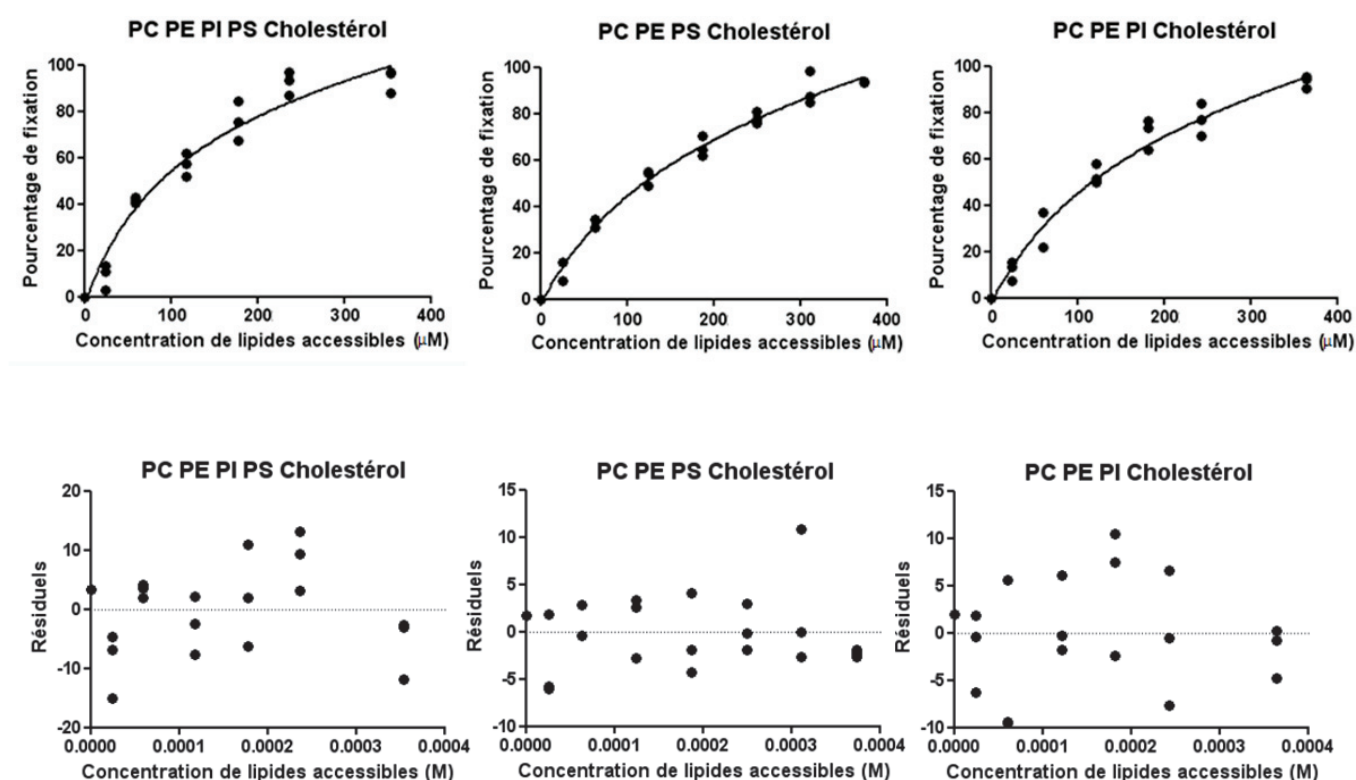


Figure 56 : Pourcentage de fixation de la NDPK-B en fonction de la concentration en lipides accessibles (en μM) (A). Le K_D est calculé à l'aide d'une régression non linéaire réalisée avec Prism®. (B) Calculs des résiduelles suggérant que le modèle peut être réaliste (B).

Composition	Kd
PC-PE-PI-PS-cholestérol	97,2 μM
PC-PE-PS-cholestérol	155,9 μM
PC-PE-PI-cholestérol	150,3 μM

Tableau 11 : Tableau des résultats de constante de dissociation de la NDPK-B pour 3 compositions lipidiques différentes.

Les résultats présentés correspondent au meilleur ajustement obtenu, la répartition aléatoire des résiduelles suggère un modèle réaliste. Cependant, il est important de noter que l'extrapolation à des concentrations plus importantes suggère que la fixation de la protéine peut dépasser 100 %. Puisqu'aucune saturation n'est observée, le modèle n'est pas juste, même si c'est le seul modèle qui correspond le mieux aux données expérimentales.

Les résultats de calcul de K_D sont reportés dans le Tableau 11. Sur PC-PE-PS-PI-ch, le K_D est de 97,2 μM . Lorsque l'une des têtes polaires chargée négativement est supprimée au profit de l'autre, le K_D augmente jusqu'à environ 150 μM . Il semble que la suppression d'une des deux têtes polaires chargées négativement (PS ou PI) induit une perte d'affinité pour la membrane sans pour autant observer de préférence pour l'une de ces deux têtes polaires.

Ces essais ont permis d'avoir un ordre de grandeur du K_D (centaine de μM). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment par la méthode de sédimentation (Baughman *et al.*, 2008). Cette affinité pour les membranes est plutôt faible. Par exemple, l'annexine V, une autre protéine interagissant avec le feuillet interne de la membrane plasmique, est capable de fixer des vésicules contenant 20 mol% PS avec une constante de dissociation autour de 1 nM (Thiagarajan et Tait, 1990).

4.8. Discussion :

Parmi les différentes isoformes de NDPK, qui diffèrent par leur localisation subcellulaire, la NDPK-B, une isoforme cytoplasmique et/ou nucléaire selon le cycle cellulaire (Bosnar *et al.*, 2009; Bosnar *et al.*, 2004), est impliquée dans différents processus physiologiques comme la synthèse de macromolécules biologiques (protéines, lipides, acides nucléiques), le trafic cellulaire de vésicules, la signalisation, ou encore l'apoptose, sans que son rôle précis soit bien défini. De plus, il a été montré que la NDPK-B favoriserait le processus de cancérisation des cellules, mais que sa surexpression dans les cellules métastatiques conduirait à une diminution de leur pouvoir métastatique.

La NDPK-B est une enzyme décrite comme étant associée à plusieurs membranes cellulaires : réticulum endoplasmique, golgi, membrane plasmique. Au niveau de la membrane plasmique, elle interagit avec des protéines périphériques ou membranaires, comme le récepteur du thromboxane A₂ ou le canal ionique KCa 3.1, et est par conséquent impliquée dans des fonctions d'échange avec l'extérieur de la cellule (transport d'ions, signalisation, ...). Plusieurs études ont montré la capacité de la NDPK-B à fixer directement les membranes (Mitchell *et al.*, 2009 ; Baughman *et al.*, 2008), nous avons donc analysé les caractéristiques de cette interaction ainsi que ses conséquences sur la structure de la protéine et l'organisation des membranes, en termes de fluidité (mesuré par étude de la fluorescence du Laurdan), d'hydratation (mesuré par spectroscopie infrarouge) et d'organisation latérale (visualisé par microscopie d'interface) des lipides, grâce à l'utilisation de méthodes biophysiques appliquées à des systèmes biomimétiques : liposomes, monocouches, et bicouches supportées.

4.8.1. Caractéristiques de l'interaction NDPK-B/membranes modèles

Nous avons tout d'abord étudié les caractéristiques de l'interaction (forces mises en jeu, capacité à pénétrer les membranes, influence de la force ionique,...) de la NDPK-B avec des membranes modèles contenant des lipides du feuillet interne de la membrane plasmique (PC, PE, PS, PI, cholestérol). En effet, le mécanisme par lequel une protéine interagit avec les lipides a des conséquences biologiques importantes. Le mode d'interaction détermine non seulement la spécificité et l'affinité pour la membrane, mais également les effets possibles de la protéine sur la morphologie et la dynamique de la membrane (Lemmon *et al.*, 2008).

Nous avons tout d'abord étudié la fixation de la NDPK-B sur des liposomes de différentes compositions et les résultats indiquent que la protéine n'est capable de se fixer que lorsque les liposomes contiennent des phospholipides anioniques (PS, PI) suggérant une composante électrostatique importante dans le processus d'interaction. Les expériences de fixation sur liposomes en présence de différentes concentrations de NaCl, montrent l'existence d'une composante hydrophobe qui est cependant insuffisante à elle seule pour permettre la fixation de la protéine aux membranes.

Les expériences sur monocouches de Langmuir ont permis de calculer une pression d'insertion maximale (PIM) de la NDPK-B de 30 mN/m pour des monocouches de PC-PE-PS-PI-ch. Cette valeur est du même ordre que celle obtenue dans le cas de la calcineurine non-myristoylée, une Ser/thr protéine phosphatase : 31 mN/m pour une monocouche de POPC :POPS (1 :1) et 27 mN/m pour un mélange POPC-POPS (4 :1) (Calvez *et al.*, 2009), connue pour pénétrer les membranes de manière partielle. Par analogie, la NDPK-B serait donc capable de s'insérer à la surface d'une membrane lipidique. Les mesures de polarisation à double interférométrie sur bicouches supportées confirment que la NDPK-B s'insère dans les membranes au niveau des têtes polaires des phospholipides.

D'un point de vue global, la NDPK-B est capable d'interagir avec les phospholipides quel que soit le modèle membranaire utilisé (vésiculaire ou plan). Des résultats très récents de polarisation à double interférométrie (non décrits dans le manuscrit), semblent indiquer qu'en présence de 50mM NaCl, la fixation de la NDPK-B est moins importante qu'en absence de sels. Ceci est contraire aux résultats d'interaction sur modèle vésiculaire et pourrait être expliqué par l'absence de courbure des bicouches supportées qui s'accompagnerait d'une distribution légèrement différente des sels à la surface de la membrane et/ou d'un écartement des têtes polaires des phospholipides insérés dans les liposomes. La courbure des systèmes lipidiques ne semble pas influencer la capacité de la NDPK-B à fixer les membranes mais,

elle pourrait la moduler : plus la membrane est courbée, plus la protéine aurait de capacité à interagir avec les phospholipides.

Comme démontré dans le chapitre précédent par mesures de remontée à l'interface air-eau et de fluorescence de l'ANS, la NDPK-B présente des zones hydrophobes en surface capables de l'ancrer à la membrane. Comme l'ajout de 150 mM de NaCl à la NDPK-B préalablement fixée aux liposomes ainsi que l'ajout de substrat nucléotidiques (Mitchell *et al.*, 2009) conduisent à sa désorption, cet ancrage à la membrane est réversible

L'exposition de zones hydrophobes à la surface de la protéine semble être une condition nécessaire pour une interaction directe avec les membranes comme cela a déjà été montré dans le cas de la CKmt puisque la NDPK-A, qui présente les mêmes acides aminés que la NDPK-B, ne se fixe pas aux lipides. Cela signifie que la seule présence des deux résidus Lys56 et Arg58, impliqués dans la fixation de la NDPK-B aux membranes, n'est pas suffisante pour conduire à la fixation de la protéine.

Un mécanisme en deux étapes a été mis en évidence : l'adsorption préalable de la NDPK-B à la surface de la membrane est suivie d'une pénétration partielle au sein des phospholipides. Ainsi, la fixation de la NDPK-B à la membrane est initiée par une interaction électrostatique importante et s'accompagne d'une composante hydrophobe de moindre ampleur. Cette reconnaissance électrostatique protéine/membrane est fréquente parmi les protéines périphériques de la membrane plasmique (protéine kinase C, protéine Gag du virus HIV, annexine V,...). Ce mécanisme en deux temps rappelle fortement celui montré dans le cas de la CKmt (Maniti *et al.*, 2010).

4.8.2. Une interaction en deux étapes : quelle affinité ?

La NDPK-B est une protéine qui présente une localisation cellulaire dépendante du cycle cellulaire (Bosnar *et al.*, 2009) et qui est impliquée dans un certain nombre de processus biologiques à différents endroits de la cellule selon les stimuli environnementaux, comme l'apoptose, la transcription, l'endocytose... Nous avons donc mesuré la fixation de la NDPK-B (à une concentration constante de 1 μ M) à des quantités variables de liposomes. La constante de dissociation alors calculée est de l'ordre du micromolaire (entre 100 et 150 μ M). Cette faible affinité de la NDPK-B pour les membranes pourrait indiquer un ancrage à la membrane transitoire pour pouvoir se déplacer au sein de la cellule selon les différents stimuli. Le rôle de l'interaction de la NDPK-B avec la membrane est peu documentée, mais on pourrait imaginer un stimulus permettant à la NDPK-B de se transloquer au niveau de la

membrane plasmique où elle serait capable d'interagir directement avec les phospholipides pour réaliser une fonction biologique.

La désorption de la NDPK-B dans le cytoplasme pourrait se faire par augmentation de la concentration locale en substrats, l'augmentation de force ionique ou par interaction avec un autre partenaire protéique dont l'affinité est plus grande que celle de la NDPK-B pour les phospholipides.

4.8.3.Effet sur l'état physique et l'organisation des lipides

Nous avons étudié l'effet de la fixation de la NDPK-B sur l'hydratation des différents groupements, phosphates, esters et chaînes acyles, des phospholipides naturels du feuillet interne de la membrane plasmique (PC-PE-PS-PI ou PC-PE-PS-PI-cholestérol) par spectroscopie infrarouge. L'analyse des spectres montre qu'en présence de NDPK-B, l'hydratation des groupements est diminuée quelle que soit la composition (en présence ou non de cholestérol). Ceci traduit une baisse de fluidité membranaire en présence de NDPK-B.

Une étude de la fluorescence du Laurdan, une sonde sensible à la polarité de l'environnement, a été menée en parallèle et montre la capacité de la NDPK-B à modifier les propriétés de fluorescence de la sonde, insérée dans les liposomes PC-PE-PS-PI, et qui rend compte d'une baisse de fluidité de la membrane induite par la NDPK-B.

En présence de cholestérol, cet effet n'est plus visible. Sachant que les spectres infrarouges montrent l'influence de la protéine sur la baisse de fluidité membranaire en présence de cholestérol, il semble donc que la fluorescence du Laurdan n'est pas suffisamment sensible à ces modifications dans de telles conditions.

Grâce à l'étude de fluorescence du LAURDAN, nous avons également mis en évidence la capacité de la NDPK-B à modifier la température de transition de phase de phospholipides saturés (DMPC-DMPG, DMPC-DMPS en présence ou non de cholestérol). Cette modification de la température de transition de phase ne semble concerner que les lipides chargés négativement comme le DMPG ou le DMPS, provoquant une séparation de phase (voir résultats page 130) ce qui suggère un rôle ségrégant de la protéine.

Cette modification de la T_m donc de la fluidité peut avoir des conséquences physiologiques importantes puisque de nombreux processus cellulaires dépendent des propriétés de la membrane. En effet, la fluidité de la membrane peut influencer la diffusion latérale de lipides et de protéines membranaires tels des récepteurs avec des conséquences drastiques sur la signalisation, l'endocytose, ... (Delmas *et Lin*, 2011; Sanchez *et al.*, 2010).

Nous avons alors étudié l'effet de la NDPK-B sur l'organisation latérale des phospholipides par visualisation de films lipidiques monomoléculaires à l'interface air-eau grâce à la microscopie à angle de Brewster. L'injection de NDPK-B sous une monocouche contenant des phospholipides anioniques (PC-PE-PS-PI, PS, PC-PS) conduit à la formation de domaines brillants qui augmentent en taille et en nombre au cours du temps. Cet effet n'est pas visible sur des monocouches zwitterioniques (PC, PC-PE). La baisse de fluidité des membranes, précédemment observée, induite par la protéine s'accompagne donc d'une formation de domaines protéolipidiques, impliquant au moins la PS, comme ce qui a été décrit pour plusieurs protéines (CKmt, NDPK-D,...) (Maniti *et al.*, 2009 ; Francois-moutal *et al.*, 2013).

Cette ségrégation lipidique peut conduire, *in vivo*, à la formation ou la stabilisation de plateformes lipidiques. La NDPK-B est connue pour interagir avec des protéines périphériques et intégrales: integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 α (ICAP-1 α) (Fournier *et al.*, 2003) lors de l'adhésion cellulaire, le récepteur du thromboxane A2... De par son activité d'histidine kinase, la NDPK-B est également capable d'activer le canal ionique KCa 3.1 (Srivastava *et al.*, 2006). Ainsi, la formation de plateformes phospholipidiques pourrait être initiée par la NDPK-B dans le but de stabiliser ces interactions et/ou de fournir les nucléotides nécessaires au niveau de la membrane plasmique, notamment le GTP pour le GTP pour les GTPases ou l'ATP pour des flippases comme la phosphatidylsérine flippase, qui catalyse le transfert de la PS depuis le feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane plasmique.

4.8.4.Effet de l'interaction sur la structure de la protéine

Nous avons montré que la fluorescence de la NDPK-B à une longueur d'onde d'excitation de 295 nm n'était pas modifiée par la fixation de la protéine aux membranes. Aucun résidu tryptophane n'est donc impliqué directement dans l'interaction avec les phospholipides.

Les mesures de REES, qui rendent compte de la modification de l'environnement de résidus tryptophane, montrent cependant que la protéine subit un changement conformationnel suite à l'interaction avec les lipides. Ce changement de structure a également été mis en évidence par spectroscopie infrarouge, montrant un changement des rapports hélice α vs feuillets β suite à la fixation de la NDPK-B.

Les données sont insuffisantes pour évaluer l'importance et les conséquences de cette modification de structure protéique. Les modifications, qui peuvent n'impliquer que les sous-

unités en contact avec les phospholipides, conduisent-elles à l'inhibition de l'activité ? Si oui, ces changements structuraux doivent être réversibles, puisque la NDPK-B désorbée des membranes est pleinement active.

4.8.5. Comparaison NDPK-B/NDPK-D : conséquences de la fixation des protéines sur les propriétés physiques des membranes

Alors que l'isoforme cytosolique nécessite une interaction électrostatique importante de première intention, la NDPK-D est capable de se fixer aux membranes quelle que soit leur charge. De plus, la résistance de la NDPK-D fixée à l'augmentation de la force ionique indique qu'une composante hydrophobe permet un ancrage plus fort que dans le cas de la NDPK-B, complètement désorbée à 150 mM NaCl. Les différences dans le mécanisme de fixation peuvent également être expliquées par des différences dans le site de fixation de ces deux enzymes : Lys56-Arg58 pour la NDPK-B et Arg89-Arg90-Lys91 dans la NDPK-D (la numérotation de la NDPK-D est décalée à cause des 33 résidus de la séquence de localisation mitochondriale située en N-terminal et qui est clivée lors de la translocation dans l'organite). L'arginine supplémentaire, retrouvée uniquement chez la NDPK-D, lui permettrait une interaction plus forte avec les phospholipides.

De plus, la fluorescence excitée à une longueur d'onde de 295 nm de la NDPK-D est directement modifiée par sa fixation, contrairement à la NDPK-B. L'implication du résidu Trp133, commun aux deux structures, dans la fixation semble donc différente : il semble être directement impliqué dans l'interaction avec les phospholipides dans le cas de la NDPK-D, ce qui n'est pas le cas dans l'interaction NDPK-B/ membrane. Comme les résidus aromatiques comme le Trp ou le Tyr sont des acides aminés hydrophobes, l'implication différente du Trp133, peut expliquer en partie les comportements des deux enzymes en présence du NaCl. Un autre candidat à l'origine de cette différence d'interaction serait la Tyr34, uniquement retrouvée dans la séquence de l'isoforme mitochondriale.

Les spectres infrarouges indiquent en outre que, malgré un effet similaire des NDPK-B et NDPK-D sur l'hydratation des têtes polaires et des groupements esters, ces deux isoenzymes induisent des modifications opposées de l'hydratation des chaînes acyles : alors que la NDPK-D l'augmente, traduisant un effet de fluidification, la NDPK-B la diminue, ce qui correspond à une augmentation de la rigidité des phospholipides. Ainsi, l'ensemble des résultats indique que le mécanisme de fixation de la NDPK-B est différent de celui observé

dans le cas de la NDPK-D et provoque des effets différents sur les membranes au niveau des chaînes acyles.

Conclusion générale/ Perspectives

Le point de départ de ce travail était l'étude de l'interaction de la NDPK-D, une isoforme mitochondriale de NDPK, avec la membrane interne de la mitochondrie. Nous avons montré la capacité de cette enzyme à fixer les liposomes quelle que soit la charge portée par les lipides (PC-PE-CL ou PC) démontrant la présence de deux composantes : une électrostatique et une hydrophobe. Cette interaction implique un résidu Trp et s'accompagne d'un remodelage de la structure de la protéine. De plus, la fixation de la NDPK-D aux membranes induit une baisse de l'état d'hydratation des groupements esters et phosphates des lipides quelle que soit la charge de la membrane. Cependant, la "fluidification" des chaînes acyles des lipides par la protéine n'est observée que lorsque la membrane est chargée négativement. Nous avons également montré la formation de domaines protéolipidiques qui nécessite la présence de la CL, un phospholipide particulier jouant un rôle dans de nombreuses fonctions physiopathologiques. Ainsi, toute modification spatiotemporelle de la répartition de ce lipide peut avoir des conséquences sur les processus impliquant ce phospholipide, comme l'apoptose, la chaîne respiratoire,... La NDPK-D, en plus de son activité catalytique, jouerait donc aussi un rôle dans la structuration des membranes.

Dans le but de déterminer d'autres protéines de l'espace intermembranaire sont capables d'avoir les mêmes effets sur l'organisation latérale des phospholipides, nous avons ensuite étudié les effets de la fixation du cytochrome *c*, sur l'organisation de membranes contenant de la CL et nous les avons comparé avec ceux obtenus avec la créatine kinase mitochondriale (CKmt) et la NDPK-D. Nous avons montré un effet beaucoup plus faible du cytochrome *c* sur la fluidité membranaire et sur l'organisation latérale des phospholipides alors que les deux enzymes induisent une baisse de la fluidité membranaire qui s'accompagne de la formation de domaines protéolipidiques. Il est possible d'envisager que le cytochrome *c* "subisse" l'organisation de la CL induite par des protéines comme la NDPK-D ou la CKmt. Cette organisation de la CL pourrait être fonction des besoins énergétiques dans la cellule dans le cas de la CKmt.

Les NDPK-A et NDPK-B sont deux autres isoformes du groupe I retrouvées associées avec un certain nombre de membranes biologiques comme la membrane plasmique ou le réticulum endoplasmique (Baughman *et al.*, 2008; Bosnar *et al.*, 2009). Ces deux NDPKs et la

NDPK-D présentent des pourcentages d'identité élevés (53 à 88%), pourtant elles présentent un certain nombre de différences (pI, localisation cellulaire,...).

Pour aller plus loin dans la caractérisation de ces isoformes, nous avons étudié les caractéristiques structurales de trois de ces isoformes : la NDPK-A, la NDPK-B et la NDPK-D. Nous avons étudié la fixation des NDPK-A, NDPK-B et NDPK-D sur des vésicules biomimétiques et nous avons montré qu'elles présentaient des comportements différents en présence de liposomes. Quelle que soit la composition des liposomes, zwitterionique ou anionique, la NDPK-A n'a jamais été retrouvée associée aux phospholipides dans nos conditions. Sa fixation aux membranes *in vivo* pourrait donc se faire via un partenaire protéique ou un autre partenaire lipidique. Un des partenaires possible est Arf6-GTP (Palacios *et al.*, 2002), protéine membranaire périphérique, nécessitant du GTP et capable d'interagir avec la NDPK-A.

La NDPK-B est capable de se lier à des vésicules chargées négativement mais pas à des liposomes globalement neutres. La NDPK-D interagit avec les deux types de compositions lipidiques. L'une des raisons possibles à cette différence de fixation est le résidu Arg90 qui n'est présent que dans le site de fixation de la NDPK-D, remplacé par un acide aspartique dans les deux autres isoformes, ce qui pourrait diminuer d'autant plus l'interaction. Nous avons également montré des différences de surfaces hydrophobes qui peuvent expliquer la différence de comportement vis-à-vis des lipides.

Nous avons ensuite déterminé les caractéristiques de l'interaction NDPK-B/membrane et les conséquences structurales de cette interaction sur la protéine et les phospholipides. Nous avons montré l'importance des forces électrostatiques dans l'interaction NDPK-B/membrane, qui s'accompagnent d'une composante hydrophobe de moindre importance. Le mécanisme de l'interaction se fait en deux temps : il y a d'abord adsorption de la protéine à la surface de la membrane puis pénétration partielle au sein des phospholipides. Ceci s'accompagne d'une baisse de la fluidité membranaire et de la formation de domaines protéo-lipidiques. La formation de domaines protéo-lipidiques permettrait de former ou de stabiliser des plateformes impliquant des protéines membranaires ou périphériques nécessitant de l'énergie, comme du CTP pour la synthèse lipidique, ou une phosphorylation par la NDPK-B (comme le canal K.Ca 3.1)(Srivastava *et al.*, 2006).

D'un point de vue structural, il y a un remodelage des structures secondaires (augmentation du rapport hélices α /feuillet β) qui peuvent impliquer l'apparition de nouvelles fonctions ou de nouvelles interactions.

En conclusion, l'étude des différentes interactions protéine-membrane a permis de préciser les caractéristiques et les conséquences de la fixation de deux NDPKs au niveau de membranes modèles. Ces résultats ont permis de suggérer une nouvelle implication biologique possible des NDPK-B et NDPK-D : la structuration des membranes.

De plus, chacune des interactions protéines/membrane étudiées a montré la diversité des modes de fixation et des effets sur la structure protéique et lipidique. Cette diversité rend compte de la modulation des systèmes biologiques.

Deux axes de recherche principaux sont à envisager pour la suite des travaux. L'un est basé sur l'approfondissement de l'étude mécanistique pure des interactions NDPK-modèles membranaires afin de les caractériser de manière plus détaillée. L'autre axe pencherait vers un aspect plus fonctionnel de ces interactions afin de mettre en évidence les implications biologiques potentielles.

Axe mécanistique :

Les NDPK-B et NDPK-D présentent des modes de fixation différents. Deux résidus d'acides aminés peuvent expliquer l'origine de ces différences : Arg90 (cet acide aminé n'est retrouvé que dans la séquence de la NDPK-D) et Trp133 (qui semble impliqué dans la fixation de la NDPK-D aux membranes). Des expériences de mutagenèse dirigée permettraient de valider l'importance de ces deux résidus dans la fixation de la NDPK-D aux membranes.

La composition des complexes protéolipidiques observés en BAM en présence de NDPK-D et d'une monocouche de PC-PE-CL n'a pas été élucidée. Une des techniques à envisager serait la visualisation de monocouches contenant des phospholipides fluorescents en présence de NDPK-D marquée par un groupement fluorescent, par microscopie de fluorescence. Ceci permettrait de mettre en évidence la co-localisation de la protéine avec un ou plusieurs phospholipides.

Nous avons fait l'hypothèse que la NDPK-D était capable de pénétrer au sein des membranes de manière différente selon la charge de la membrane. Des mesures de pression limite d'insertion et des mesures de DPI sont à envisager afin de confirmer cette hypothèse.

Nous avons pu mettre en évidence une insertion de domaines de la NDPK-B au sein de monocouches et bicouches, lorsque la membrane est chargée négativement. Cependant, nous ne pouvons pas attribuer précisément une identité à ces domaines. Des mutations ponctuelles permettraient de mettre en évidence de telles structures.

Le PIP₂, bien que peu représenté dans les membranes plasmiques (1 % (Van Meer *et al.*, 2008)) est un phospholipide important dans la fixation à la membrane plasmique d'un grand nombre de protéines extrinsèques (Ben-Aissa *et al.*, 2012). Ainsi, l'influence du PIP₂ sur la fixation et l'affinité de la NDPK-B à la membrane plasmique est à étudier.

La NDPK-B est capable de former des domaines protéo-lipidiques en présence de PS. Cependant, dans la composition du feuillet interne de la membrane plasmique, il y a également de la PI. Il serait donc nécessaire de refaire les expériences en présence de ce phospholipide afin de voir si l'effet de la NDPK-B sur l'organisation des lipides se limite à la PS ou s'il suffit d'avoir un phospholipide chargé négativement.

La NDPK-B peut ponter les membranes grâce à sa structure symétrique. Il faudrait étudier la capacité de la NDPK-B à transférer ou non des phospholipides depuis un liposome donneur vers un liposome accepteur, par FRET ou par réapparition de fluorescence, comme cela a été décrit dans le cas de la NDPK-D (Epand *et al.*, 2007). Une telle capacité pourrait impliquer la NDPK-B dans le transport de lipides au sein des différentes membranes des organites.

Une des questions qui reste en suspens est la capacité des NDPK-B et NDPK-D fixées aux membranes à réaliser leur activité enzymatique. Schlattner et collaborateurs ont récemment décrit un modèle de switch entre activité enzymatique et activité de transfert de lipides (Schlattner *et al.*, 2013):

Lorsque la NDPK-D est associée à la membrane via ses deux faces opposées, il y a un encombrement stérique du site actif par les membranes, l'activité de transfert de phosphate est inhibée mais la NDPK-D catalyse alors un transfert de lipides entre les deux membranes. Lorsque la NDPK-D est fixée par seulement une de ses faces, l'autre face peut encore réaliser son activité enzymatique.

Les auteurs font l'hypothèse qu'un tel switch se fait lorsque la concentration en cardiolipine est suffisamment importante dans la membrane externe de la mitochondrie pour la NDPK-D puisse s'y fixer.

Il serait intéressant d'une part d'étudier la capacité de la NDPK-B à catalyser un transfert de lipides entre deux membranes et d'autre part de déterminer si cette isoforme subit également un tel switch activité transfert de phosphate/transfert de lipides.

La visualisation de GUVs contenant des lipides marqués en présence de NDPK marquée permettrait d'avoir une idée sur l'enchaînement des grandes étapes de l'interaction/agrégation des NDPK-B et -D avec les vésicules. En effet, la formation de domaines a-t-elle lieu avant ou après l'agrégation ?

Axe fonctionnel :

Il est certain que l'implication de la NDPK-D dans la cellule, et encore plus celle de son interaction avec les membranes de la mitochondrie, restent à déterminer. Des études sur le rôle de la NDPK-D dans la physiologie de la mitochondrie sont à envisager. Par exemple, l'extinction de l'expression de la NDPK-D par des siRNA dans des cellules de foie et la visualisation des mitochondries permettrait de valider ou non sa réelle implication dans la formation de points de contact. Ce genre d'expérience a déjà été réalisé dans le cas de la CKmt (Lenz *et al.*, 2007), et montre l'implication de cette enzyme dans la structuration de la mitochondrie.

La transfection d'ADN codant la NDPK-B dans plusieurs lignées cellulaires induit une diminution de leur potentiel métastatique (Miyazaki *et al.*, 1999). De plus, quelques études montrent que la membrane plasmique de ces cellules présente une fluidité différente de celle des cellules normales. En effet, le rapport cholestérol/phospholipides et les taux de chaînes acyles insaturés sont modifiés (Sherbet, 1989; Zeisig *et al.*, 2007). Il serait intéressant d'étudier l'effet de la NDPK-B sur des membranes extraites de cellules cancéreuses et d'éventuellement relier, au moins de manière partielle, activité antimétastatique avec modification de la fluidité membranaire locale. Ce genre de mécanisme a été déjà décrit dans le cas de CLX, un inhibiteur de la cyclo-oxygénase 2, qui présente une activité anti-métastatique de par sa capacité à rigidifier la membrane plasmique (Sade *et al.*, 2012).

Annexe : “Cardiolipin provides a docking platform for caspase-8 activation that bridge Fas-induced apoptosis with mitochondria”

Cette étude a fait l'objet d'une collaboration avec le Dr Patrice PETIT de l'unité INSERM S-747 Toxicologie, Pharmacologie et Signalisation cellulaire, et a été publiée dans PLoS One. Le but des travaux était d'étudier la fixation de protéines proapoptotiques, la caspase-8 et tBid, sur la cardiolipine, ainsi que les conséquences de ces interactions protéine-lipide sur l'organisation de modèles membranaires.

Rappels bibliographiques:

On nomme apoptose (ou mort cellulaire programmée) le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire, qui est physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire.

L'apoptose conduit à l'activation de protéases à cystéine appelées caspases (Kroemer *et al.*, 1995), responsables des phénomènes biochimiques observés: exposition de phosphatidylsérine à la surface de la membrane cellulaire, arrêt de la réplication, fragmentation du noyau et du cytosquelette entraînant la formation de corps apoptotiques phagocytés par les cellules environnantes.

Le mécanisme d'apoptose est gouverné par deux voies principales d'activation (Hengartner, 2000) :

- une voie dite intrinsèque mettant particulièrement en jeu la mitochondrie. Cette voie est initiée par l'activation de caspases de manière directe ou indirecte (par l'intermédiaire de changements intracellulaires tels que les dommages de l'ADN, qui induisent le relargage de plusieurs facteurs pro-apoptotiques capables d'activer les caspases effectrices).

- une voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF comme par exemple CD95 (APO1/Fas). L'interaction du ligand spécifique de Fas, appelé Fas L, avec la partie extracellulaire du récepteur de mort Fas déclenche l'oligomérisation du récepteur, ainsi que la formation immédiate de DISC (death-inducing signaling complex) (Kischkel *et al.*, 1995), un complexe multimoléculaire incluant la protéine FADD (Boldin *et al.*, 1996; Chinnaiyan *et al.*, 1995) et les domaines de mort de Fas. Cette

formation induit le recrutement et l'activation de caspases, notamment la caspase-8 (Muzio *et al.*, 1996; Scaffidi *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). La caspase-8 active est alors relarguée du DISC pour effectuer son rôle de caspase.

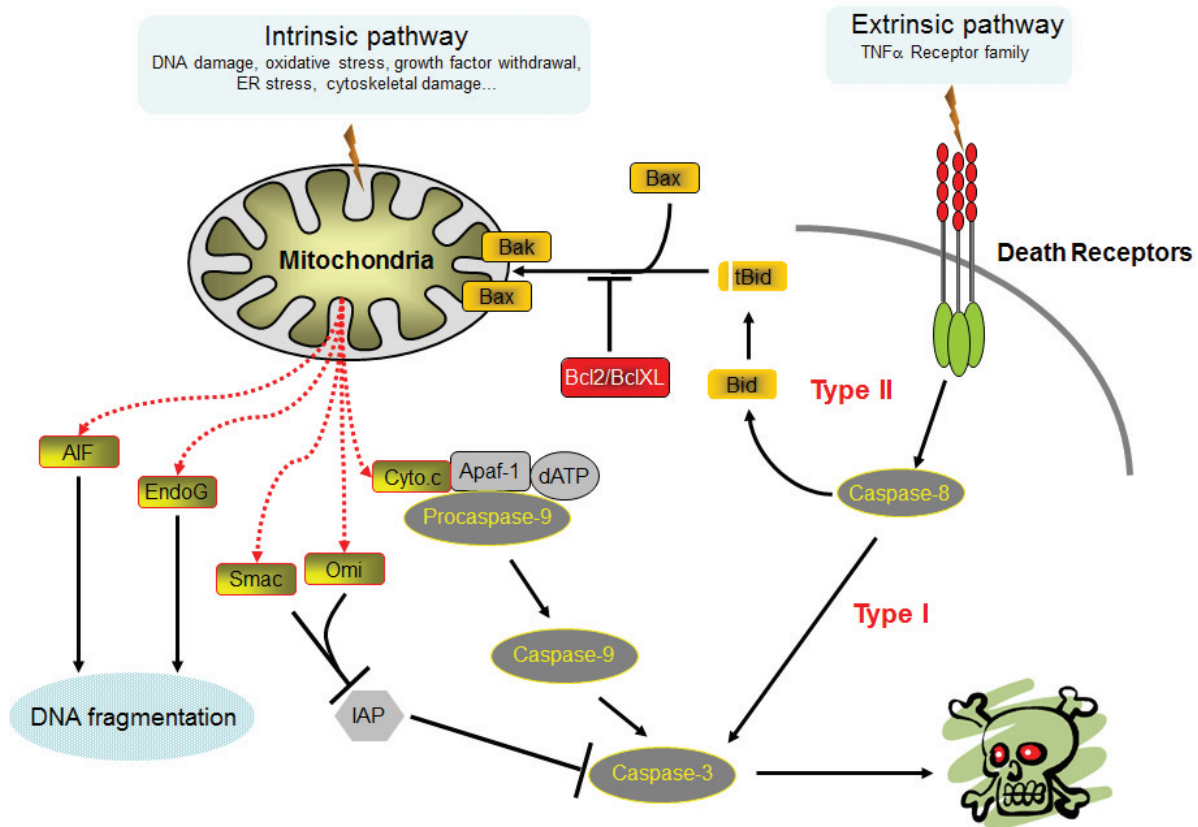


Figure 57 : Les deux voies principales d'activation de la mort cellulaire programmée.

Le lien le mieux caractérisé entre les deux voies apoptotiques est Bid, membre de la famille Bcl-2, qui est transporté dans la mitochondrie après clivage par la caspase-8. La dimérisation de deux monomères de caspase-8 (p55/p55) résulte en un changement conformationnel qui expose le site actif de la caspase via le mécanisme de « proximité induite » (Keller *et al.*, 2009; Muzio *et al.*, 1998). La dimérisation a été démontrée comme suffisante pour l'activation de la caspase-8, mais il a été proposé que la meilleure activité requiert l'autoclivage (Boatright *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2009; Keller *et al.*, 2009). Le premier clivage de la caspase-8 se fait entre les domaines p18 et p10 ce qui forme un hétérodimère au sein d'un hétérotétramère complexe (p43-p10/p43-p10). Ce premier clivage est nécessaire pour la reconnaissance d'autres substrats, comme les caspases effectrices (i.e. caspase-3) et Bid (Chang *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2009).

L'apoptose via la voie extrinsèque peut suivre deux chemins différents, type I ou type II, qui dépendent du niveau d'activation de la caspase-8 sous la formation de DISC (Scaffidi *et al.*, 1998). Dans les cellules de type I, de grandes quantités de DISC et de caspase-8 active sont formées et conduisent au clivage direct des caspases effectrices dans le cytosol (Lee *et al.*, 2006). Dans les cellules de type II, l'assemblage de DISC est plus lent et la production de caspase-8 est moindre (Scaffidi *et al.*, 1998). De plus, il a été également montré que XIAP (X linked inhibitor of apoptosis) est capable d'exercer un effet inhibiteur sur cette voie (Jost *et al.*, 2009). Par conséquent, les cellules présentant un haut niveau de XIAP exigeraient une amplification de la cascade de caspases médiée par tBid (forme tronquée de Bid) pour dominer l'effet inhibiteur de XIAP. Dans ce contexte, la caspase-8 doit s'engager dans la voie intrinsèque pour amplifier le signal de mort et exécuter l'apoptose. La transition depuis la voie extrinsèque vers la voie intrinsèque est achevée via le traitement de Bid par la caspase-8 (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998) conduisant à la formation de tBid. tBid peut alors interagir avec la cardiolipine via son domaine en hairpin (ou épingle à cheveux) (Gonzalvez *et al.*, 2010) et perturber les mécanismes qui précèdent la délocalisation de Bax/Bak (Gonzalvez *et al.*, 2005) et la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie.

Grâce à des études sur des cellules lymphoblastoïdes (cellules de type II) dérivées de cellules de patients atteints du syndrome de Barth ainsi que sur des cellules HeLa présentant un knock-down de la tafazzin (cellules ne présentant pas de cardiolipine mature mais une accumulation de monolysocardiolipine), il a été démontré récemment que durant l'apoptose par voie extrinsèque des cellules de type II induite par FAS, la surface de la mitochondrie devient enrichie en caspase-8 (Gonzalvez *et al.*, 2008). En effet, l'association de caspase-8 avec la mitochondrie ainsi que la formation de p43/p10 sont alors bloquées dû à l'absence de cardiolipine mature. Le clivage de Bid est empêché et l'apoptose n'a pas lieu. D'autres résultats soulignent le fait que la caspase-8 et Bid forment un complexe supramoléculaire à la surface de la mitochondrie (Schug *et al.*, 2011). Ceci montre qu'il existe un mécanisme par lequel un faible taux de caspase-8 active est capable de cibler spécifiquement Bid à la surface de la mitochondrie pour produire tBid (Schug *et al.*, 2011). Il a été prouvé que tBid peut se fixer à la CL (Gonzalvez *et al.*, 2005; Gonzalvez *et al.*, 2010; Lutter *et al.*, 2000b; Lutter *et al.*, 2001). Il apparaît que la CL, retrouvée de manière prédominante dans la membrane interne de la mitochondrie, est également enrichie dans les sites de contact entre les membranes externes et internes, où elle induit la formation de phase H_{II} (Ardail *et al.*, 1990). Par conséquent, la CL est accessible depuis l'extérieur de la mitochondrie. Il semble donc que

les facteurs nécessaires pour la formation d'une plateforme caspase-8/cardiolipin/Bid à la membrane mitochondriale soient potentiellement disponibles depuis le cytoplasme.

Il a été suggéré que ces plateformes se formeraient au niveau des sites de contact au sein de la mitochondrie, où la CL et tBid sont localisés. Une déstabilisation de cette plateforme altère la transduction du signal de l'apoptose médiée par les récepteurs dans des pathologies telles que le syndrome de Barth, où la cardiolipine est en faible quantité et non mature. Le rôle de la CL serait d'ancrer et de concentrer la caspase-8 au niveau des sites de contact entre les membranes externes et internes, facilitant ainsi son auto-activation, le recrutement de Bid et l'obtention de tBid suivie par les altérations dans la structure et la fonction de la mitochondrie, la délocalisation de Bax et l'achèvement de l'apoptose. Dans l'article qui suit, un système *in vitro* qui mime et simplifie la membrane mitochondriale au niveau des sites de contact a été mis au point. La plateforme caspase-8/Bid/CL a été reconstituée sur des GUVs et des LUVs. Les vésicules contenant de la CL ont été analysées par des techniques de cytofluorométrie, de microscopie confocale et par des approches biophysiques comme les suivis de rupture/tension et les mesures de fluorescence du Laurdan réalisées au laboratoire.

Les propriétés de fluorescence du Laurdan ont été utilisées afin de suivre l'organisation et la fluidité des lipides membranaires suite à la fixation simultanée ou séparée de la caspase-8, de Bid ou de tBid sur des liposomes composés de PC ou PC-CL. Les données sont exprimées sous forme de GP_{exc} et sont montrées dans la figure 2 de l'article.

Les résultats montrent la capacité de la caspase-8 et de tBid seuls à modifier l'environnement du LAURDAN, dans le sens d'une "rigidification" de la membrane contenant de la cardiolipine. Ce résultat est en concordance avec les données précédentes selon lesquelles tBid promeut la formation de phases lamellaires hautement courbées (Epanand *et al.*, 2002)) et influence l'organisation de monocouches lipidiques.

Cette modification de la fluorescence du LAURDAN est plus prononcée lorsque la pro-caspase-8 et Bid-FL sont ajoutées simultanément aux vésicules. On peut supposer que cet effet est le résultat de la mise en place de la plateforme fonctionnelle caspase-8-CL qui permet le clivage de BidFL en tBid. Ces résultats montrent que les lipides des membranes mitochondriales jouent un rôle dans la régulation de l'activité des protéines de la famille Bcl-2 (Garcia-Saez *et al.*, 2009).

Titre : Caspase-8 binding to cardiolipin in giant unilamellar vesicles provides a functional docking platform for Bid.

Auteurs : Jalmar O., Francois-Moutal L., Garcia-Saez A-J., Perry M., Granjon T., Gonzalvez F., Gottlieb E., Ayala-Sanmartin J., Klösgen B, Schwille P., Petit P.X.

[PLoS One](#). 2013;8(2):e55250. doi: 10.1371/journal.pone.0055250. Epub 2013 Feb 13.

Résumé :

La caspase-8 est impliquée dans l'apoptose médiée par des récepteurs de mort dans les cellules de type II, le programme pro apoptotique déclenché par la forme tronquée de Bid. En effet, la caspase-8 et Bid sont des intermédiaires connus dans cette voie de signalisation. De plus, la cardiolipine a été montrée comme étant capable de fournir un point d'ancrage et une plateforme essentielle d'activation pour la caspase-8 à la surface de la membrane mitochondriale. La déstabilisation de cette plateforme altère l'apoptose médiée par des récepteurs dans des maladies comme le syndrome de Barth, caractérisé par la présence de CL immature ne permettant pas la fixation de la caspase-8. Un système *in vitro* simplifié mimant les sites de contact et/ou les microdomaines enrichis en CL sur la surface de la membrane mitochondriale externe a été utilisé. La plateforme constituée de la caspase-8, Bid et de la cardiolipine a ainsi été reconstituée dans des vésicules géantes.

Ces vésicules ont été analysées par cytométrie de flux et les résultats ont confirmé les résultats précédents montrant la nécessité de cardiolipines matures intactes pour l'activation de la caspase-8 et du clivage et de la fixation de Bid. La microscopie confocale a également été utilisée afin de visualiser la rupture des vésicules et leur revésiculation à des tailles plus petites, due à l'altération de la courbure, résultant de la fixation de la caspase-8 et de tBid. Des approches biophysiques, comme la fluorescence du Laurdan et des mesures de rupture/tension, ont été utilisées pour déterminer la capacité de ces trois composants (CL, caspase-8 et Bid) à fournir les exigences minimales pour la formation d'une plateforme active au niveau de la mitochondrie. Les résultats font la lumière sur le rôle fonctionnel actif de la cardiolipine, qui fait le lien entre les récepteurs de mort et la mitochondrie.

Références

- Agarwal, R. P., B. Robison et R. E. Parks, Jr. (1978). Nucleoside diphosphokinase from human erythrocytes. *Methods Enzymol* **51**: 376-386.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et P. Walter (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York, Garland Science.
- Anan, K., T. Morisaki, M. Katano, A. Ikubo, H. Kitsuki, A. Uchiyama, S. Kuroki, M. Tanaka et M. Torisu (1996). Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. *Surgery* **119**: 333-339.
- Angeletti, S., B. Maggio et S. Genti-Raimondi (2004). Surface activity and interaction of StarD7 with phospholipid monolayers. *Biochem Biophys Res Commun* **314**: 181-185.
- Ardail, D., J. P. Privat, M. Egret-Charlier, C. Levrat, F. Lerme et P. Louisot (1990). Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem* **265**: 18797-18802.
- Arrondo, J. L., F. M. Goni et J. M. Macarulla (1984). Infrared spectroscopy of phosphatidylcholines in aqueous suspension. A study of the phosphate group vibrations. *Biochim Biophys Acta* **794**: 165-168.
- Bagatolli, L. A. (2006). To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochim Biophys Acta* **1758**: 1541-1556.
- Bago, R., J. Pavelic, G. Maravic Vlahovicek et M. H. Bosnar (2009). Nm23-H1 promotes adhesion of CAL 27 cells in vitro. *Mol Carcinog* **48**: 779-789.
- Balakrishnan, G., Y. Hu, O. F. Oyerinde, J. Su, J. T. Groves et T. G. Spiro (2007). A conformational switch to beta-sheet structure in cytochrome c leads to heme exposure. Implications for cardiolipin peroxidation and apoptosis. *J Am Chem Soc* **129**: 504-505.
- Bandorowicz-Pikula, J., A. F. Sikorski, K. Bialkowska et A. Sobota (1996). Interaction of annexins IV and VI with phosphatidylserine in the presence of Ca²⁺: monolayer and proteolytic study. *Mol Membr Biol* **13**: 241-250.
- Bangham, A. D., M. M. Standish et J. C. Watkins (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* **13**: 238-252.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta* **1767**: 1073-1101.
- Basova, L. V., I. V. Kurnikov, L. Wang, V. B. Ritov, N. A. Belikova, Vlasova, II, A. A. Pacheco, D. E. Winnica, J. Peterson, H. Bayir, D. H. Waldeck et V. E. Kagan (2007). Cardiolipin switch in mitochondria: shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity. *Biochemistry* **46**: 3423-3434.
- Baughman, C., J. Morin-Leisk et T. Lee (2008). Nucleoside diphosphate kinase B (NDKB) scaffolds endoplasmic reticulum membranes in vitro. *Exp Cell Res* **314**: 2702-2714.
- Beales, P. A., C. L. Bergstrom, N. Geerts, J. T. Groves et T. K. Vanderlick (2011). Single vesicle observations of the cardiolipin-cytochrome C interaction: induction of membrane morphology changes. *Langmuir* **27**: 6107-6115.
- Ben-Aissa, K., G. Patino-Lopez, N. V. Belkina, O. Maniti, T. Rosales, J. J. Hao, M. J. Kruhlak, J. R. Knutson, C. Picart et S. Shaw (2012). Activation of Moesin, a Protein That Links Actin Cytoskeleton to the Plasma Membrane, Occurs by Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) Binding Sequentially to Two Sites and Releasing an Autoinhibitory Linker. *J Biol Chem* **287**: 16311-16323.
- Bensadoun, A. et D. Weinstein (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* **70**: 241-250.

- Berg, P. et W. K. Joklik (1953). Transphosphorylation between nucleoside polyphosphates. *Nature* **172**: 1008-1009.
- Berthomieu, C. et R. Hienerwadel (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynth Res* **101**: 157-170.
- Beutner, G., A. Ruck, B. Riede et D. Brdiczka (1998). Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta* **1368**: 7-18.
- Boatright, K. M., M. Renatus, F. L. Scott, S. Sperandio, H. Shin, I. M. Pedersen, J. E. Ricci, W. A. Edris, D. P. Sutherlin, D. R. Green et G. S. Salvesen (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **11**: 529-541.
- Boissan, M., S. Dabernat, E. Peuchant, U. Schlattner, I. Lascu et M. L. Lacombe (2009). The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement. *Mol Cell Biochem* **329**: 51-62.
- Boldin, M. P., T. M. Goncharov, Y. V. Goltsev et D. Wallach (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**: 803-815.
- Bosnar, M. H., R. Bago et H. Cetkovic (2009). Subcellular localization of Nm23/NDPK A and B isoforms: a reflection of their biological function? *Mol Cell Biochem* **329**: 63-71.
- Bosnar, M. H., J. De Gunzburg, R. Bago, L. Brecevic, I. Weber et J. Pavelic (2004). Subcellular localization of A and B Nm23/NDPK subunits. *Exp Cell Res* **298**: 275-284.
- Burgess, R. R. (2009). Protein precipitation techniques. *Methods Enzymol* **463**: 331-342.
- Bushnell, G. W., G. V. Louie et G. D. Brayer (1990). High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c. *J Mol Biol* **214**: 585-595.
- Callis, P. R. et T. Liu (2004). Quantitative Prediction of Fluorescence Quantum Yields for Tryptophan in Proteins. *J. Phys. Chem. B* **108**: 4248-4259.
- Calvez, P., E. Demers, E. Boisselier et C. Salesse (2011). Analysis of the contribution of saturated and polyunsaturated phospholipid monolayers to the binding of proteins. *Langmuir* **27**: 1373-1379.
- Chang, D. W., Z. Xing, V. L. Capacio, M. E. Peter et X. Yang (2003). Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J* **22**: 4132-4142.
- Chattopadhyay, A. et R. Rukmini (1993). Restricted mobility of the sole tryptophan in membrane-bound melittin. *FEBS Lett* **335**: 341-344.
- Cherfils, J., S. Morera, I. Lascu, M. Veron et J. Janin (1994). X-ray structure of nucleoside diphosphate kinase complexed with thymidine diphosphate and Mg²⁺ at 2-Å resolution. *Biochemistry* **33**: 9062-9069.
- Chiadmi, M., S. Morera, I. Lascu, C. Dumas, G. Le Bras, M. Veron et J. Janin (1993). Crystal structure of the Awd nucleotide diphosphate kinase from *Drosophila*. *Structure* **1**: 283-293.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari et V. M. Dixit (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**: 505-512.
- Cho, W. et R. V. Stahelin (2005). Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**: 119-151.
- Choi, S. Y., F. Gonzalez, G. M. Jenkins, C. Slomianny, D. Chretien, D. Arnoult, P. X. Petit et M. A. Frohman (2007). Cardiolipin deficiency releases cytochrome c from the inner mitochondrial membrane and accelerates stimuli-elicited apoptosis. *Cell Death Differ* **14**: 597-606.

- Chong, P. L. et P. T. Wong (1993). Interactions of Laurdan with phosphatidylcholine liposomes: a high pressure FTIR study. *Biochim Biophys Acta* **1149**: 260-266.
- Cipollini, G., A. Berti, L. Fiore, G. Rainaldi, F. Basolo, G. Merlo, G. Bevilacqua et M. A. Caligo (1997). Down-regulation of the nm23.h1 gene inhibits cell proliferation. *Int J Cancer* **73**: 297-302.
- Cladera, J., M. Sabes et E. Padros (1992). Fourier transform infrared analysis of bacteriorhodopsin secondary structure. *Biochemistry* **31**: 12363-12368.
- Comte, J., B. Maisterrena et D. C. Gautheron (1976). Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes. *Biochim Biophys Acta* **419**: 271-284.
- Cortese, J. D., A. L. Voglino et C. R. Hackenbrock (1998). Multiple conformations of physiological membrane-bound cytochrome c. *Biochemistry* **37**: 6402-6409.
- Cullis, P. R. et B. de Kruijff (1979). Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* **559**: 399-420.
- Delmas, D. et H. Y. Lin (2011). Role of membrane dynamics processes and exogenous molecules in cellular resveratrol uptake: consequences in bioavailability and activities. *Mol Nutr Food Res* **55**: 1142-1153.
- Demchenko, A. P. (1988). Site-selective excitation: a new dimension in protein and membrane spectroscopy. *Trends Biochem Sci* **13**: 374-377.
- DiNitto, J. P., T. C. Cronin et D. G. Lambright (2003). Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Sci STKE* **2003**: re16.
- Dumas, C., I. Lascu, S. Morera, P. Glaser, R. Fourme, V. Wallet, M. L. Lacombe, M. Veron et J. Janin (1992). X-ray structure of nucleoside diphosphate kinase. *EMBO J* **11**: 3203-3208.
- Duriez, B., P. Duquesnoy, E. Escudier, A. M. Bridoux, D. Escalier, I. Rayet, E. Marcos, A. M. Vojtek, J. F. Bercher et S. Amselem (2007). A common variant in combination with a nonsense mutation in a member of the thioredoxin family causes primary ciliary dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 3336-3341.
- Engel, M., M. Veron, B. Theisinger, M. L. Lacombe, T. Seib, S. Dooley et C. Welter (1995). A novel serine/threonine-specific protein phosphotransferase activity of Nm23/nucleoside-diphosphate kinase. *Eur J Biochem* **234**: 200-207.
- Engelman, D. M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**: 578-580.
- Epand, R. F., J. C. Martinou, M. Fornallaz-Mulhauser, D. W. Hughes et R. M. Epand (2002). The Apoptotic Protein tBid Promotes Leakage by Altering Membrane Curvature. *J Biol Chem* **277**: 32632-32639.
- Epand, R. F., U. Schlattner, T. Wallimann, M. L. Lacombe et R. M. Epand (2007). Novel lipid transfer property of two mitochondrial proteins that bridge the inner and outer membranes. *Biophys J* **92**: 126-137.
- Epand, R. M., D. Bach, N. Borochoy et E. Wachtel (2000). Cholesterol crystalline polymorphism and the solubility of cholesterol in phosphatidylserine. *Biophys J* **78**: 866-873.
- Erent, M., P. Gonin, J. Cherfils, P. Tissier, G. Raschella, A. Giartosio, F. Agou, C. Sarger, M. L. Lacombe, M. Konrad et I. Lascu (2001). Structural and catalytic properties and homology modelling of the human nucleoside diphosphate kinase C, product of the DRnm23 gene. *Eur J Biochem* **268**: 1972-1981.
- Fan, J., M. Sammalkorpi et M. Haataja (2009). Formation and regulation of lipid microdomains in cell membranes: theory, modeling, and speculation. *FEBS Lett* **584**: 1678-1684.

- Forner, F., L. J. Foster, S. Campanaro, G. Valle et M. Mann (2006). Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver. *Mol Cell Proteomics* **5**: 608-619.
- Fournier, H. N., C. Albiges-Rizo et M. R. Block (2003). New insights into Nm23 control of cell adhesion and migration. *J Bioenerg Biomembr* **35**: 81-87.
- Francois-Moutal, L., O. Maniti, O. Marcillat et T. Granjon (2013). New insights into lipid-Nucleoside Diphosphate Kinase-D interaction mechanism: Protein structural changes and membrane reorganisation. *Biochim Biophys Acta* **1828**: 906-915.
- Garcia-Saez, A. J., G. Ries, M. Orzaez, E. Perez-Paya et P. Schwallie (2009). membrane promotes tBid interaction with Bcl-XL. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 1178-1185.
- Gellerich, F. N., M. Schlame, R. Bohnensack et W. Kunz (1987). Dynamic compartmentation of adenine nucleotides in the mitochondrial intermembrane space of rat-heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **890**: 117-126.
- Gericke, A., E. R. Smith, D. J. Moore, R. Mendelsohn et J. Storch (1997). Adipocyte fatty acid-binding protein: interaction with phospholipid membranes and thermal stability studied by FTIR spectroscopy. *Biochemistry* **36**: 8311-8317.
- Gilles, A. M., E. Presecan, A. Vonica et I. Lascu (1991). Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polypeptide chains responsible for heterogeneity of the hexameric enzyme. *J Biol Chem* **266**: 8784-8789.
- Giraud, M. F., F. Georgescauld, I. Lascu et A. Dautant (2006). Crystal structures of S120G mutant and wild type of human nucleoside diphosphate kinase A in complex with ADP. *J Bioenerg Biomembr* **38**: 261-264.
- Glasoe, P. K. et F. A. Long (1960). Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *J. Physiol. Chem.* **64**: 188-190.
- Gonin, P., Y. Xu, L. Milon, S. Dabernat, M. Morr, R. Kumar, M. L. Lacombe, J. Janin et I. Lascu (1999). Catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinase investigated using nucleotide analogues, viscosity effects, and X-ray crystallography. *Biochemistry* **38**: 7265-7272.
- Gonzalvez, F. et E. Gottlieb (2007). Cardiolipin: setting the beat of apoptosis. *Apoptosis* **12**: 877-885.
- Gonzalvez, F., F. Pariselli, P. Dupaigne, I. Budihardjo, M. Lutter, B. Antonsson, P. Diolez, S. Manon, J. C. Martinou, M. Goubern, X. Wang, S. Bernard et P. X. Petit (2005). tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell Death Differ* **12**: 614-626.
- Gonzalvez, F., F. Pariselli, O. Jalmar, P. Dupaigne, F. Sureau, M. Dellinger, E. A. Hendrickson, S. Bernard et P. X. Petit (2010). Mechanistic issues of the interaction of the hairpin-forming domain of tBid with mitochondrial cardiolipin. *PLoS One* **5**: e9342.
- Gonzalvez, F., Z. T. Schug, R. H. Houtkooper, E. D. Mackenzie, D. G. Brooks, R. J. Wanders, P. X. Petit, F. M. Vaz et E. Gottlieb (2008). Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *J Cell Biol* **183**: 681-696.
- Gopal, R., K. W. Foster et P. Yang (2012). The DPY-30 Domain and Its Flanking Sequence Mediate the Assembly and Modulation of Flagellar Radial Spoke Complexes. *Mol Cell Biol* **32**: 4012-4024.
- Granjon, T., O. Maniti, Y. Auchli, P. Dahinden, R. Buchet, O. Marcillat et P. Dimroth (2008). Structure-function relations in oxaloacetate decarboxylase complex. Fluorescence and infrared approaches to monitor oxomalonate and Na(+) binding effect. *PLoS One* **5**: e10935.
- Granjon, T., M. J. Vacheron, C. Vial et R. Buchet (2001). Mitochondrial creatine kinase binding to phospholipids decreases fluidity of membranes and promotes new lipid-

- induced beta structures as monitored by red edge excitation shift, laurdan fluorescence, and FTIR. *Biochemistry* **40**: 6016-6026.
- Groger, T., S. Nathoo, T. Ku, C. Sikora, R. J. Turner et E. J. Prenner (2010). Real-time imaging of lipid domains and distinct coexisting membrane protein clusters. *Chem Phys Lipids* **165**: 216-224.
- Gruner, S. M., P. R. Cullis, M. J. Hope et C. P. Tilcock (1985). Lipid polymorphism: the molecular basis of nonbilayer phases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **14**: 211-238.
- Halдар, S., A. Chaudhuri et A. Chattopadhyay (2011). Organization and dynamics of membrane probes and proteins utilizing the red edge excitation shift. *J Phys Chem B* **115**: 5693-5706.
- Hanukoglu, I. (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **43**: 779-804.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.
- Henon, S. et J. Meunier (1991). Microscope at the Brewster angle: Direct observation of first-order phase transitions in monolayers. *Rev. Sci. Instrum.* **62**: 936-939.
- Herlan, M., F. Vogel, C. Bornhovd, W. Neupert et A. S. Reichert (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem* **278**: 27781-27788.
- Hilgemann, D. W. et R. Ball (1996). Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP2. *Science* **273**: 956-959.
- Hirst, D. J., T. H. Lee, M. J. Swann, S. Unabia, Y. Park, K. S. Hahm et M. I. Aguilar (2011). Effect of acyl chain structure and bilayer phase state on binding and penetration of a supported lipid bilayer by HPA3. *Eur Biophys J* **40**: 503-514.
- Hönig, D. et D. Möbius (1991). Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. *J. Phys. Chem.* **95**: 4590-4592.
- Hope-Roberts, M., R. W. Horobin et M. Wainwright (2011). Identifying apoptotic cells with the 3-hydroxyflavone derivative F2N12S, a ratiometric fluorescent small molecule probe selective for plasma membranes: a possible general mechanism for selective uptake into apoptotic cells. *Biotech Histochem* **86**: 255-261.
- Hoppins, S., L. Lackner et J. Nunnari (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**: 751-780.
- Hughes, M. A., N. Harper, M. Butterworth, K. Cain, G. M. Cohen et M. MacFarlane (2009). Reconstitution of the death-inducing signaling complex reveals a substrate switch that determines CD95-mediated death or survival. *Mol Cell* **35**: 265-279.
- Ikeda, T. (2010). NDP kinase 7 is a conserved microtubule-binding protein preferentially expressed in ciliated cells. *Cell Struct Funct* **35**: 23-30.
- Incardona, J. P. et S. Eaton (2000). Cholesterol in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 193-203.
- Ishihara, N., A. Jofuku, Y. Eura et K. Mihara (2003). Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **301**: 891-898.
- Ishijima, Y., N. Shimada, M. Fukuda, H. Miyazaki, N. Y. Orlov, T. G. Orlova, T. Yamada et N. Kimura (1999). Overexpression of nucleoside diphosphate kinases induces neurite outgrowth and their substitution to inactive forms leads to suppression of nerve growth factor- and dibutyryl cyclic AMP-induced effects in PC12D cells. *FEBS Lett* **445**: 155-159.

- Israelachvili, J. N., S. Marcelja et R. G. Horn (1980). Physical principles of membrane organization. *Q. Rev. Biophys.* **13**: 121-200.
- Jalmar, O., L. Francois-Moutal, A. J. Garcia-Saez, M. Perry, T. Granjon, F. Gonzalvez, E. Gottlieb, J. Ayala-Sanmartin, B. Klosgen, P. Schwillle et P. X. Petit (2013). Caspase-8 binding to cardiolipin in giant unilamellar vesicles provides a functional docking platform for bid. *PLoS One* **8**: e55250.
- Jiang, F., M. T. Ryan, M. Schlame, M. Zhao, Z. Gu, M. Klingenberg, N. Pfanner et M. L. Greenberg (2000). Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem* **275**: 22387-22394.
- Jost, P. J., S. Grabow, D. Gray, M. D. McKenzie, U. Nachbur, D. C. Huang, P. Bouillet, H. E. Thomas, C. Borner, J. Silke, A. Strasser et T. Kaufmann (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* **460**: 1035-1039.
- Kaetzel, D. M. (2003). Transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**: 427-446.
- Kang, Y., D. C. Lee, J. Han, S. Yoon, M. Won, J. H. Yeom, M. J. Seong, J. J. Ko, K. A. Lee, K. Lee et J. Bae (2007). NM23-H2 involves in negative regulation of Diva and Bcl2L10 in apoptosis signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **359**: 76-82.
- Kawasaki, K., O. Kuge, S. C. Chang, P. N. Heacock, M. Rho, K. Suzuki, M. Nishijima et W. Dowhan (1999). Isolation of a chinese hamster ovary (CHO) cDNA encoding phosphatidylglycerophosphate (PGP) synthase, expression of which corrects the mitochondrial abnormalities of a PGP synthase-defective mutant of CHO-K1 cells. *J Biol Chem* **274**: 1828-1834.
- Keller, N., J. Mares, O. Zerbe et M. G. Grutter (2009). Structural and biochemical studies on procaspase-8: new insights on initiator caspase activation. *Structure* **17**: 438-448.
- Kim, S. H., M. Fountoulakis, N. J. Cairns et G. Lubec (2002). Human brain nucleoside diphosphate kinase activity is decreased in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* **296**: 970-975.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer et M. E. Peter (1995). Cytotoxicity-dependent Apo-1 (FAs/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **14**: 5579-5588.
- Klymchenko, A. S., G. Duportail, Y. Mely et A. P. Demchenko (2003). Ultrasensitive two-color fluorescence probes for dipole potential in phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11219-11224.
- Klymchenko, A. S., H. Stoeckel, K. Takeda et Y. Mely (2006). Fluorescent probe based on intramolecular proton transfer for fast ratiometric measurement of cellular transmembrane potential. *J Phys Chem B* **110**: 13624-13632.
- Kottke, M., V. Adams, T. Wallimann, V. K. Nalam et D. Brdiczka (1991). Location and regulation of octameric mitochondrial creatine kinase in the contact sites. *Biochim Biophys Acta* **1061**: 215-225.
- Kroemer, G., P. X. Petit, N. Zamzami, J.-L. Vayssière et B. Mignotte (1995). The biochemistry of apoptosis. *FASEB J.* **9**: 1277-1287.
- Lacombe, M. L., L. Milon, A. Munier, J. G. Mehus et D. O. Lambeth (2000). The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr* **32**: 247-258.
- Lacombe, M. L., M. Tokarska-Schlattner, R. F. Epand, M. Boissan, R. M. Epand et U. Schlattner (2009). Interaction of NDPK-D with cardiolipin-containing membranes: Structural basis and implications for mitochondrial physiology. *Biochimie* **91**: 779-783.
- Lakowicz, J. R. et S. Keating-Nakamoto (1984). Red-edge excitation of fluorescence and dynamic properties of proteins and membranes. *Biochemistry* **23**: 3013-3021.

- Lascu, I. et P. Gonin (2000). The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr* **32**: 237-246.
- Lee, K. H., C. Feig, V. Tchikov, R. Schickel, C. Hallas, S. Schutze, M. E. Peter et A. C. Chan (2006). The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J* **25**: 1009-1023.
- Lee, T. H., K. N. Hall, M. J. Swann, J. F. Popplewell, S. Unabia, Y. Park, K. S. Hahm et M. I. Aguilar (2010a). The membrane insertion of helical antimicrobial peptides from the N-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1. *Biochim Biophys Acta* **1798**: 544-557.
- Lee, T. H., C. Heng, M. J. Swann, J. D. Gehman, F. Separovic et M. I. Aguilar (2010b). Real-time quantitative analysis of lipid disordering by aurein 1.2 during membrane adsorption, destabilisation and lysis. *Biochim Biophys Acta* **1798**: 1977-1986.
- Lee, T. H., H. Mozsolits et M. I. Aguilar (2001). Measurement of the affinity of melittin for zwitterionic and anionic membranes using immobilized lipid biosensors. *J Pept Res* **58**: 464-476.
- Lenne, P. F., L. Wawrezinieck, F. Conchonaud, O. Wurtz, A. Boned, X. J. Guo, H. Rigneault, H. T. He et D. Marguet (2006). Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *EMBO J* **25**: 3245-3256.
- Lentz, B. R. (2003). Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res* **42**: 423-438.
- Lenz, H., M. Schmidt, V. Welge, T. Kueper, U. Schlattner, T. Wallimann, H. P. Elsasser, K. P. Wittern, H. Wenck, F. Staeb et T. Blatt (2007). Inhibition of cytosolic and mitochondrial creatine kinase by siRNA in HaCaT- and HeLaS3-cells affects cell viability and mitochondrial morphology. *Mol Cell Biochem* **306**: 153-162.
- Leone, A., U. Flatow, C. R. King, M. A. Sandeen, I. M. Margulies, L. A. Liotta et P. S. Steeg (1991). Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell* **65**: 25-35.
- Lewis, R. N., R. N. McElhaney, W. Pohle et H. H. Mantsch (1994). Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation. *Biophys J* **67**: 2367-2375.
- Li, H., H. Zhu, C. J. Xu et J. Yuan (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491-501.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Lucken-Ardjomande, S., S. Montessuit et J. C. Martinou (2008). Contributions to Bax insertion and oligomerization of lipids of the mitochondrial outer membrane. *Cell Death Differ* **15**: 929-937.
- Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter et X. Wang (1998). Bid, a bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface receptors. *Cell* **94**: 481-490.
- Lutter, M., M. Fang, X. Luo, M. Nishijima, X. Xie et X. Wang (2000a). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* **2**: 754-761.
- Lutter, M., M. Fang, X. Luo, M. Nishijima, X. Xie et X. Wang (2000b). Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol* **2**: 754-761.
- Lutter, M., G. A. Perkins et X. Wang (2001). The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol* **2**: 22.
- Ma, D., Z. Xing, B. Liu, N. G. Pedigo, S. G. Zimmer, Z. Bai, E. H. Postel et D. M. Kaetzel (2002). NM23-H1 and NM23-H2 repress transcriptional activities of nuclease-hypersensitive elements in the platelet-derived growth factor-A promoter. *J Biol Chem* **277**: 1560-1567.

- MacDonald, N. J., A. De la Rosa, M. A. Benedict, J. M. Freije, H. Krutsch et P. S. Steeg (1993). A serine phosphorylation of Nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential. *J Biol Chem* **268**: 25780-25789.
- MacDonald, R. C., R. I. MacDonald, B. P. Menco, K. Takeshita, N. K. Subbarao et L. R. Hu (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1061**: 297-303.
- Maget-Dana, R., D. Lelievre et A. Brack (1999). Surface active properties of amphiphilic sequential isopeptides: Comparison between alpha-helical and beta-sheet conformations. *Biopolymers* **49**: 415-423.
- Maniti, O., M. F. Lecompte, O. Marcillat, B. Desbat, R. Buchet, C. Vial et T. Granjon (2009). Mitochondrial creatine kinase binding to phospholipid monolayers induces cardiolipin segregation. *Biophys J* **96**: 2428-2438.
- Marcillat, O., D. Goldschmidt, D. Eichenberger et C. Vial (1987). Only one of the two interconvertible forms of mitochondrial creatine kinase binds to heart mitoplasts. *Biochim Biophys Acta* **890**: 233-241.
- Marcillat, O., C. Perraut, T. Granjon, C. Vial et M. J. Vacheron (1999). Cloning, *Escherichia coli* expression, and phase-transition chromatography-based purification of recombinant rabbit heart mitochondrial creatine kinase. *Protein Expr Purif* **17**: 163-168.
- Marsh, D. (1996). Lateral pressure in membranes. *Biochim Biophys Acta* **1286**: 183-223.
- Martinez, R., D. Venturelli, D. Perrotti, M. L. Veronese, K. Kastury, T. Druck, K. Huebner et B. Calabretta (1997). Gene structure, promoter activity, and chromosomal location of the DR-nm23 gene, a related member of the nm23 gene family. *Cancer Res* **57**: 1180-1187.
- Mayer, L. D., M. J. Hope et P. R. Cullis (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta* **858**: 161-168.
- Milon, L., P. Meyer, M. Chiadmi, A. Munier, M. Johansson, A. Karlsson, I. Lascu, J. Capeau, J. Janin et M. L. Lacombe (2000). The human nm23-H4 gene product is a mitochondrial nucleoside diphosphate kinase. *J Biol Chem* **275**: 14264-14272.
- Milon, L., M. F. Rousseau-Merck, A. Munier, M. Erent, I. Lascu, J. Capeau et M. L. Lacombe (1997). nm23-H4, a new member of the family of human nm23/nucleoside diphosphate kinase genes localised on chromosome 16p13. *Hum Genet* **99**: 550-557.
- Mitchell, K. A., G. Szabo et S. O. A. de (2009). Direct binding of cytosolic NDP kinases to membrane lipids is regulated by nucleotides. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 469-476.
- Miyazaki, H., M. Fukuda, Y. Ishijima, Y. Takagi, T. Iimura, A. Negishi, R. Hirayama, N. Ishikawa, T. Amagasa et N. Kimura (1999). Overexpression of nm23-H2/NDP kinase B in a human oral squamous cell carcinoma cell line results in reduced metastasis, differentiated phenotype in the metastatic site, and growth factor-independent proliferative activity in culture. *Clin Cancer Res* **5**: 4301-4307.
- Morera, S., M. Chiadmi, G. LeBras, I. Lascu et J. Janin (1995a). Mechanism of phosphate transfer by nucleoside diphosphate kinase: X-ray structures of the phosphohistidine intermediate of the enzymes from *Drosophila* and *Dictyostelium*. *Biochemistry* **34**: 11062-11070.
- Morera, S., M. L. Lacombe, Y. Xu, G. LeBras et J. Janin (1995b). X-ray structure of human nucleoside diphosphate kinase B complexed with GDP at 2 Å resolution. *Structure* **3**: 1307-1314.
- Morera, S., I. Lascu, C. Dumas, G. LeBras, P. Briozzo, M. Veron et J. Janin (1994). Adenosine 5'-diphosphate binding and the active site of nucleoside diphosphate kinase. *Biochemistry* **33**: 459-467.

- Munier, A., C. Feral, L. Milon, V. P. Pinon, G. Gyapay, J. Capeau, G. Guellaen et M. L. Lacombe (1998). A new human nm23 homologue (nm23-H5) specifically expressed in testis germinal cells. *FEBS Lett* **434**: 289-294.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter et V. M. Dixit (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**: 817-827.
- Muzio, M., B. R. Stockwell, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen et V. M. Dixit (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**: 2926-2930.
- Negroni, A., D. Venturelli, B. Tanno, R. Amendola, S. Ransac, V. Cesi, B. Calabretta et G. Raschella (2000). Neuroblastoma specific effects of DR-nm23 and its mutant forms on differentiation and apoptosis. *Cell Death Differ* **7**: 843-850.
- Nielsen, S. B. et D. E. Otzen (2010). Impact of the antimicrobial peptide Novicidin on membrane structure and integrity. *J Colloid Interface Sci* **345**: 248-256.
- Nomura, K., H. Imai, T. Koumura, T. Kobayashi et Y. Nakagawa (2000). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J* **351**: 183-193.
- Ohtsuka, T., M. Nishijima et Y. Akamatsu (1993a). A somatic cell mutant defective in phosphatidylglycerophosphate synthase, with impaired phosphatidylglycerol and cardiolipin biosynthesis. *J Biol Chem* **268**: 22908-22913.
- Ohtsuka, T., M. Nishijima, K. Suzuki et Y. Akamatsu (1993b). Mitochondrial dysfunction of a cultured Chinese hamster ovary cell mutant deficient in cardiolipin. *J Biol Chem* **268**: 22914-22919.
- Ohvo-Rekila, H., B. Ramstedt, P. Leppimäki et J. P. Slotte (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* **41**: 66-97.
- Osman, C., D. R. Voelker et T. Langer Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol* **192**: 7-16.
- Palacios, F., J. K. Schweitzer, R. L. Boshans et C. D'Souza-Schorey (2002). ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly. *Nat Cell Biol* **4**: 929-936.
- Parasassi, T., G. De Stasio, G. Ravagnan, R. M. Rusch et E. Gratton (1991). Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys J* **60**: 179-189.
- Parasassi, T., M. Loiero, M. Raimondi, G. Ravagnan et E. Gratton (1993). Absence of lipid gel-phase domains in seven mammalian cell lines and in four primary cell types. *Biochim Biophys Acta* **1153**: 143-154.
- Pinon, V. P., G. Millot, A. Munier, J. Vassy, G. Linares-Cruz, J. Capeau, F. Calvo et M. L. Lacombe (1999). Cytoskeletal association of the A and B nucleoside diphosphate kinases of interphasic but not mitotic human carcinoma cell lines: specific nuclear localization of the B subunit. *Exp Cell Res* **246**: 355-367.
- Postel, E. H., S. J. Berberich, S. J. Flint et C. A. Ferrone (1993). Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis. *Science* **261**: 478-480.
- Postel, E. H., X. Zou, D. A. Notterman et K. M. La Perle (2009). Double knockout Nme1/Nme2 mouse model suggests a critical role for NDP kinases in erythroid development. *Mol Cell Biochem* **329**: 45-50.

- Pralle, A., P. Keller, E. L. Florin, K. Simons et J. K. Horber (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* **148**: 997-1008.
- Rajendran, L. et K. Simons (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* **118**: 1099-1102.
- Rochdi, M. D., G. Laroche, E. Dupre, P. Giguere, A. Lebel, V. Watier, E. Hamelin, M. C. Lepine, G. Dupuis et J. L. Parent (2004). Nm23-H2 interacts with a G protein-coupled receptor to regulate its endocytosis through an Rac1-dependent mechanism. *J Biol Chem* **279**: 18981-18989.
- Roymans, D., R. Willems, D. R. Van Blockstaele et H. Slegers (2002). Nucleoside diphosphate kinase (NDPK/NM23) and the waltz with multiple partners: possible consequences in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* **19**: 465-476.
- Sade, A., S. Tuncay, I. Cimen, F. Severcan et S. Banerjee (2012). Celecoxib reduces fluidity and decreases metastatic potential of colon cancer cell lines irrespective of COX-2 expression. *Biosci Rep* **32**: 35-44.
- Sanchez, S. A., M. A. Tricerri, G. Ossato et E. Gratton (2010). Lipid packing determines protein-membrane interactions: challenges for apolipoprotein A-I and high density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1798**: 1399-1408.
- Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer et M. E. Peter (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* **17**: 1675-1687.
- Schlame, M. (2008). Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J Lipid Res* **49**: 1607-1620.
- Schlattner, U., F. Gehring, N. Vernoux, M. Tokarska-Schlattner, D. Neumann, O. Marcillat, C. Vial et T. Wallimann (2004). C-terminal lysines determine phospholipid interaction of sarcomeric mitochondrial creatine kinase. *J Biol Chem* **279**: 24334-24342.
- Schlattner, U., M. Tokarska-Schlattner, S. Ramirez, A. Bruckner, L. Kay, C. Polge, R. F. Epand, R. M. Lee, M. L. Lacombe et R. M. Epand (2009). Mitochondrial kinases and their molecular interaction with cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* **1788**: 2032-2047.
- Schlattner, U., M. Tokarska-Schlattner, S. Ramirez, Y. Y. Tyurina, A. A. Amoscato, D. Mohammadyani, Z. Huang, J. Jiang, N. Yanamala, A. Seffouh, M. Boissan, R. F. Epand, R. M. Epand, J. Klein-Seetharaman, M. L. Lacombe et V. E. Kagan (2013). Dual function of mitochondrial Nm23-H4 protein in phosphotransfer and intermembrane lipid transfer: a cardiolipin-dependent switch. *J Biol Chem* **288**: 111-121.
- Schlegel, J., B. Zurbriggen, G. Wegmann, M. Wyss, H. M. Eppenberger et T. Wallimann (1988). Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. I. Isolation of two interconvertible mitochondrial creatine kinase forms, dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase: characterization, localization, and structure-function relationships. *J Biol Chem* **263**: 16942-16953.
- Schmidt, N., A. Mishra, G. H. Lai et G. C. Wong (2010a). Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Lett* **584**: 1806-1813.
- Schmidt, O., N. Pfanner et C. Meisinger (2010b). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 655-667.
- Schug, Z. T., F. Gonzalez, R. H. Houtkooper, F. M. Vaz et E. Gottlieb (2011). BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death Differ* **18**: 538-548.
- Scorrano, L., M. Ashiya, K. Buttle, S. Weiler, S. A. Oakes, C. A. Mannella et S. J. Korsmeyer (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* **2**: 55-67.

- Seifert, M., C. Welter, Y. Mehraein et G. Seitz (2005). Expression of the nm23 homologues nm23-H4, nm23-H6, and nm23-H7 in human gastric and colon cancer. *J Pathol* **205**: 623-632.
- Sesaki, H., C. D. Dunn, M. Iijima, K. A. Shepard, M. P. Yaffe, C. E. Machamer et R. E. Jensen (2006). Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape and alternative topogenesis of Mgm1p. *J Cell Biol* **173**: 651-658.
- Sherbet, G. V. (1989). Membrane fluidity and cancer metastasis. *Exp Cell Biol* **57**: 198-205.
- Shynkar, V. V., A. S. Klymchenko, G. Duportail, A. P. Demchenko et Y. Mely (2005). Two-color fluorescent probes for imaging the dipole potential of cell plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* **1712**: 128-136.
- Sinibaldi, F., L. Fiorucci, A. Patriarca, R. Lauceri, T. Ferri, M. Coletta et R. Santucci (2008). Insights into cytochrome c-cardiolipin interaction. Role played by ionic strength. *Biochemistry* **47**: 6928-6935.
- Song, Z., H. Chen, M. Fiket, C. Alexander et D. C. Chan (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* **178**: 749-755.
- Srivastava, S., Z. Li, K. Ko, P. Choudhury, M. Albaqumi, A. K. Johnson, Y. Yan, J. M. Backer, D. Unutmaz, W. A. Coetzee et E. Y. Skolnik (2006). Histidine phosphorylation of the potassium channel KCa3.1 by nucleoside diphosphate kinase B is required for activation of KCa3.1 and CD4 T cells. *Mol Cell* **24**: 665-675.
- Stahelin, R. V., J. D. Rafter, S. Das et W. Cho (2003). The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C- α and group IVa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **278**: 12452-12460.
- Steeg, P. S., G. Bevilacqua, R. Pozzatti, L. A. Liotta et M. E. Sobel (1988). Altered expression of NM23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus 2 Ela inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res* **48**: 6550-6554.
- Steenbergen, R., T. S. Nanowski, A. Beigneux, A. Kulinski, S. G. Young et J. E. Vance (2005). Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. *J Biol Chem* **280**: 40032-40040.
- Sud, M., E. Fahy, D. Cotter, A. Brown, E. A. Dennis, C. K. Glass, A. H. Merrill, Jr., R. C. Murphy, C. R. Raetz, D. W. Russell et S. Subramaniam (2007). LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res* **35**: D527-532.
- Surewicz, W. K., H. H. Mantsch et D. Chapman (1993). Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* **32**: 389-394.
- Thiagarajan, P. et J. F. Tait (1990). Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. *J Biol Chem* **265**: 17420-17423.
- Tokarska-Schlattner, M., M. Boissan, A. Munier, C. Borot, C. Mailleau, O. Speer, U. Schlattner et M. L. Lacombe (2008). The nucleoside diphosphate kinase D (NM23-H4) binds the inner mitochondrial membrane with high affinity to cardiolipin and couples nucleotide transfer with respiration. *J Biol Chem* **283**: 26198-26207.
- Tsuiki, H., M. Nitta, A. Furuya, N. Hanai, T. Fujiwara, M. Inagaki, M. Kochi, Y. Ushio, H. Saya et H. Nakamura (1999). A novel human nucleoside diphosphate (NDP) kinase, Nm23-H6, localizes in mitochondria and affects cytokinesis. *J Cell Biochem* **76**: 254-269.
- Tuominen, E. K., C. J. Wallace et P. K. Kinnunen (2002). Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage. *J Biol Chem* **277**: 8822-8826.
- Vacheron, M. J., E. Clottes, C. Chautard et C. Vial (1997). Mitochondrial creatine kinase interaction with phospholipid vesicles. *Arch Biochem Biophys* **344**: 316-324.

- Van Meer, G., D. Voelker et G. Feigenson (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**: 112-124.
- Velazquez, J. B. et M. S. Fernandez (2006). GPS, the slope of Laurdan generalized polarization spectra, in the study of phospholipid lateral organization and *Escherichia coli* lipid phases. *Arch Biochem Biophys* **455**: 163-174.
- Venturelli, D., R. Martinez, P. Melotti, I. Casella, C. Peschle, C. Cucco, G. Spampinato, Z. Darzynkiewicz et B. Calabretta (1995). Overexpression of DR-nm23, a protein encoded by a member of the nm23 gene family, inhibits granulocyte differentiation and induces apoptosis in 32Dc13 myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7435-7439.
- Vernoux, N. (2005). Interaction de la créatine kinase mitochondriale avec des membranes biomimétiques: liposomes, monocouches de Langmuir. *Biochimie*. Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1. **Doctorat**: 226.
- Vernoux, N., T. Granjon, O. Marcillat, F. Besson et C. Vial (2006). Interfacial behavior of cytoplasmic and mitochondrial creatine kinase oligomeric states. *Biopolymers* **81**: 270-281.
- Wallet, V., R. Mutzel, H. Troll, O. Barzu, B. Wurster, M. Veron et M. L. Lacombe (1990). Dictyostelium nucleoside diphosphate kinase highly homologous to Nm23 and Awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and *Drosophila* development. *J Natl Cancer Inst* **82**: 1199-1202.
- Wallimann, T., M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay et H. M. Eppenberger (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* **281 (Pt 1)**: 21-40.
- Weber, G. et F. J. Farris (1979). Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry* **18**: 3075-3078.
- Wernick, N. L., D. J. Chinnapen, J. A. Cho et W. I. Lencer (2010). Cholera toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum. *Toxins (Basel)* **2**: 310-325.
- Williams, R. L., D. A. Oren, J. Munoz-Dorado, S. Inouye, M. Inouye et E. Arnold (1993). Crystal structure of *Myxococcus xanthus* nucleoside diphosphate kinase and its interaction with a nucleotide substrate at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* **234**: 1230-1247.
- Yeagle, P. L. (1991). Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie* **73**: 1303-1310.
- Zeisig, R., T. Koklic, B. Wiesner, I. Fichtner et M. Sentjurs (2007). Increase in fluidity in the membrane of MT3 breast cancer cells correlates with enhanced cell adhesion in vitro and increased lung metastasis in NOD/SCID mice. *Arch Biochem Biophys* **459**: 98-106.
- Zhang, J., D. Cado, A. Chen, N. H. Kabra et A. Winoto (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* **392**: 296-300.
- Zhang, M., E. Mileykovskaya et W. Dowhan (2005). Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J Biol Chem* **280**: 29403-29408.

Source en ligne :

Avanti Polar Lipids – Preparation of liposomes [en ligne]. Disponible sur : http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&id=1384&Itemid=372 (date de la dernière consultation : 20.06.2013).